
EFFET DU MÉTHYLPARATHION PAR ADMINISTRATION ORALE SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA VIBRIOSE OCCASIONNÉE PAR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* CHEZ LA CREVETTE BLANCHE (*LITOPENAEUS VANNAMEI*)

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

Par

Laura Labrie

Née le 14 janvier 1974 à Groningen (Pays-Bas)

Directeur de thèse : Dr. Philippe GUERRE

JURY

PRESIDENT :

M. Jean-Louis FONVIEILLE

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEUR :

M. Philippe GUERRE

Maître de conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme. Frédérique MESSUD-PETIT

Maître de conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**LISTE DES ENSEIGNANTS DE
L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

DEDICACES AU JURY

À NOTRE PRESIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur Fonvieille
Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Zoologie-Parasitologie

Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury

Hommage respectueux

À NOTRE JURY DE THÈSE

Monsieur le Dr. Guerre
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pharmacologie-Toxicologie

Qui nous a soutenue et encouragée dans l'élaboration de notre thèse

Madame le Dr. Messud-Petit
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Epidémiologie-Pathologie infectieuse

Qui nous a fait l'honneur d'être membre de notre jury de thèse

En témoignage de reconnaissance et de respect

REMERCIEMENTS

Merci à ma mère, mes frères et ma sœur,

Merci à Cédric, l'amour de ma vie.

Merci à Marion, Jean Louis et Orla pour les merveilleux moments passés ensemble,

Merci à Cathy et Jean pour nous avoir accueilli sous leur toit,

Merci à tous les amis d'ici et de là-bas,

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS DE.....	2
L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE.....	2
DEDICACES AU JURY.....	3
REMERCIEMENTS.....	4
TABLE DES MATIERES.....	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	8
INDEX DES TABLEAUX.....	8
INDEX DES FIGURES.....	9
TABLE DES ABBREVIATIONS.....	10
1. INTRODUCTION.....	12
1.1. PRODUCTION MONDIALE DE CREVETTES.....	12
1.1.1. Contribution de la pêche à la production mondiale de crevettes.....	12
1.1.2. Contribution de l'aquaculture à la production mondiale de crevettes.....	12
1.1.3. Place du Mexique, Sinaloa.....	13
1.1.4. Importance de <i>Litopenaeus vannamei</i> au Mexique.....	14
1.2. LES MALADIES AFFECTANT LES CREVETTES ET LEUR ORIGINE.....	15
1.2.1. Facteurs influençant la sensibilité aux maladies.....	15
1.2.2. Les interactions entre l'hôte, son environnement et les pathogènes.....	17
1.3. VIBRIO SPP. : UN PATHOGENE OPPORTUNISTE.....	18
1.3.1. Présentation générale de <i>Vibrio</i> spp.....	18
1.3.2. Importance de la vibriose en élevage de crevettes.....	19
1.3.3. Caractéristiques générales de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20
1.3.4. Diagnostic de la vibriose.....	20
.....	20
1.4. LA POLLUTION CÔTIÈRE PAR LES PESTICIDES AGRICOLES.....	22
1.4.1. Sources de pollution.....	22
1.4.2. Pollution côtière au Mexique.....	22
1.4.3. Les organophosphorés.....	24
1.5. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	27
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	28
2.1. GÉNÉRALITÉS.....	28
2.1.1. Origine et prise en charge des <i>Litopenaeus vannamei</i>	28
2.1.2. Système expérimental.....	28
2.1.3. L'alimentation.....	30
2.1.4. Préparation de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> pour l'injection.....	31
2.1.5. Techniques d'injection et de prélèvement.....	32
2.1.6. Techniques de coloration.....	34
2.1.7. Détermination de l'activité acétylcholinestérasique.....	35
2.2. ÉTUDES PRÉLIMINAIRES.....	38

2.2.1. Détermination de la technique de coloration à utiliser et de la durée de la fluorescence de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> marqué avec le DTAF dans les tissus.	38
2.2.2. Détermination de la dose sub-létale de méthylparathion.	41
2.3. ETUDE FINALE : INFECTION D'ÉPREUVE AVEC <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> EN UTILISANT LE MÉTHYLPARATHION COMME FACTEUR DE STRESS.	42
2.3.1. Protocole général.	42
2.3.2. Détermination de l'activité acétylcholinestérasique.....	44
2.3.3. Analyse des coupes histologiques.	44
2.4 ANALYSE STATISTIQUE.....	44
2.4.1. Analyse des mortalités et de l'activité acétylcholinestérasique.	44
2.4.2. Analyse histologique.....	45
FACTEUR: TRAITEMENT, P.EX. . <i>VIBRIO</i>	46
LÉSION, EX : NÉCROSE MUSCULAIRE.....	46
OUI.....	46
NON.....	46
TOTAL.....	46
OUI.....	46
A.....	46
B.....	46
A+B.....	46
NON.....	46
C.....	46
D.....	46
C+D.....	46
TOTAL.....	46
A+C.....	46
B+D.....	46
TOTAL.....	46
LA LECTURE DU TABLEAU SE FAIT DE LA FAÇON SUIVANTE, "A" EST LE NOMBRE D'ANIMAUX EXPOSÉS AU TRAITEMENT ET QUI ONT DÉVELOPPÉ LA LÉSION, "B" EST LE NOMBRE D'ANIMAUX NON EXPOSÉS ET QUI ONT POURTANT DÉVELOPPÉ DES LÉSIONS. DE LA MÊME FAÇON, "C" EST LE NOMBRE D'ANIMAUX QUI ONT ÉTÉ EXPOSÉS MAIS QUI N'ONT PAS DÉVELOPPÉ DE LÉSIONS ET AINSI DE SUITE.	46
LE RISQUE RELATIF SERA ALORS :	46
$RR = (A/A+C) \div (B/B+D)$	46
3. RÉSULTATS.....	47
3.1. PARAMÈTRES D'EAU.....	47
3.2. ÉVALUATION DE DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE COLORATION ET ÉVALUATION DE LA DURÉE DE PERSISTANCE DANS LES TISSUS DE LA FLUORESCENCE DES <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> MARQUÉS AVEC LE DTAF	47
3.2.1. Différentes techniques de coloration.....	47
3.2.2. Détermination de la persistance de la fluorescence bactérienne.....	51
3.2.3. Amélioration de la technique de coloration DAPI.....	51
3.3. DÉTERMINATION DE LA DOSE SUB-LÉTALE DE MÉTHYLPARATHION.	53
3.3.1. Etude de la toxicité aiguë.	53
3.3.2. Etude de la toxicité subaiguë.....	56
3.4. TEST À L'ÉPREUVE AVEC <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> UTILISANT LE MÉTHYLPARATHION COMME UN FACTEUR DE STRESS.	57
3.4.1. Observations générales.....	57
3.4.2. Mortalités.	58

3.4.3. Mesure de l'activité acétylcholinestérasique.....	60
3.4.4. Analyse des sections histologiques.	61
4. DISCUSSION.....	68
4.1. MARQUAGE DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> PAR LA FLUORESCENCE.....	68
4.2. COLORATION DES TISSUS.	69
4.3. TOXICITÉ SUB-LÉTALE DU MÉTHYLPARATHION.....	70
4.3.1. Utilisation de l'exposition orale.....	70
4.3.2. Détermination d'une dose sub-létale de méthylparathion.....	71
4.3.3. Effets généraux du méthylparathion sur <i>Litopenaeus vannamei</i>	72
4.3.4. Mortalités induites par l'exposition au méthylparathion.....	72
4.4. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE L'ACÉTYLCHOLINE ESTÉRASE (AChE).	73
4.5. EFFET DU MÉTHYLPARATHION SUR LA SENSIBILITÉ DE LA CREVETTE BLANCHE À LA VIBRIOSE.....	74
4.5.1. Choix du mode d'exposition.....	74
4.5.2. L'interaction méthylparathion-Vibrio.....	75
LISTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	78
ANNEXES.....	87
ANNEXE 1. : PRÉPARATION DE L'ALIMENT CONTENANT LE MÉTHYLPARATHION.....	87
ANNEXE 2.: RÉACTIFS UTILISÉS POUR LA PRÉPARATION DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i>	89
ANNEXE 3: PROTOCOLES DE COLORATION.....	90
ANNEXE 4. LES RÉACTIFS ET SOLUTIONS UTILISÉS POUR LA DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ACÉTYLCHOLINE ESTÉRASE (AChE).....	92
ANNEXE 5. PROCÉDURE SUIVIE POUR LA CAPTURE D'IMAGE NUMÉRIQUES.....	94
ANNEXE 6. CLASSIFICATION DES LÉSIONS EN GRADES	95
I.....	101
C.....	101
C.....	101

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INDEX DES TABLEAUX

<u>TABLEAU 1.1: CAPACITÉ DE PRODUCTION EN MT EN 1988 DES FERMES DE CREVETTES AU MEXIQUE.....</u>	<u>13</u>
<u>TABLEAU 1.2: PRINCIPALES ESPÈCES DE CREVETTES MARINES PRODUITES AU MEXIQUE PAR ÉTAT ET RÉGION CÔTIÈRE.</u>	<u>14</u>
<u>TABLEAU 1.3 : EXEMPLES DE RÉSIDUS DE PESTICIDES DÉTECTÉS DANS LA BAIE D’OHUIRA, SINALOA DANS UNE ÉTUDE EFFECTUÉE DU 15 DÉCEMBRE 1997-29 SEPTEMBRE 1998.....</u>	<u>22</u>
<u>TABLEAU 1.4 : LA CONSOMMATION DE MÉTHYLPARATHION EN TONNES DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS DU MONDE..</u>	<u>24</u>
<u>TABLEAU 2.1: DISTRIBUTION DES ANIMAUX DANS L’ÉTUDE PRÉLIMINAIRE 1.....</u>	<u>38</u>
<u>TABLEAU 2.2: PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL DE L’ÉTUDE PRÉLIMINAIRE 2: DÉTERMINATION DE LA DOSE SUB-LÉTALE DE MÉTHYLPARATHION. (MPAR).....</u>	<u>42</u>
<u>TABLEAU 2.3: PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL DE L’EXPÉRIENCE FINALE : INFECTION D’ÉPREUVE AVEC VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS UTILISANT LE MÉTHYLPARATHION COMME FACTEUR DE STRESS.....</u>	<u>43</u>
<u>TABLEAU 3.2. MOYENNE, ÉCART TYPE, VALEURS MINIMALES ET MAXIMALES DE L’ACTIVITÉ ACÉTYLCHOLINESTÉRASTIQUE CHEZ LES CREVETTES NOURRIES AVEC 19,04µg MPAR/G D’ALIMENT LE PREMIER JOUR D’EXPOSITION. (NMOL.MIN-1.MG-1 PROTÉINES).....</u>	<u>56</u>
<u>TABLEAU 3.3. MOYENNE, ÉCART TYPE, VALEURS MINIMALES ET MAXIMALES DE L’ACTIVITÉ ACÉTYLCHOLINESTÉRASTIQUE CHEZ LES CREVETTES NOURRIES AVEC 5,66µg MPAR/G D’ALIMENT APRÈS 4 JOURS D’EXPOSITION. (NMOL.MIN-1.MG-1 PROTÉINES).....</u>	<u>57</u>
<u>TABLEAU 3.4 : MORTALITÉS JOURNALIÈRES PENDANT L’EXPOSITION ORALE À 6,48 MPAR µg/G D’ALIMENT ET APRÈS L’INJECTION DE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS AU JOUR 5.</u>	<u>58</u>
<u>TABLEAU 3.5. MOYENNE, ÉCART TYPE, VALEURS MINIMALES ET MAXIMALES DE L’ACTIVITÉ ACÉTYLCHOLINESTÉRASTIQUE CHEZ LES CREVETTES NOURRIES AVEC 6,48µg MPAR/G D’ALIMENT PENDANT 4 JOURS ET PRÉLEVÉES LE JOUR 5.</u>	<u>60</u>
<u>TABLEAU 3.6. MOYENNE, ÉCART TYPE, VALEURS MINIMALES ET MAXIMALES DE L’ACTIVITÉ ACÉTYLCHOLINESTÉRASTIQUE CHEZ LES CREVETTES APRÈS 4 JOURS D’EXPOSITION À 6,48µg MPAR/G D’ALIMENT ET PRÉLEVÉES LE JOUR 8.</u>	<u>60</u>
<u>TABLEAU 3.7. CLASSIFICATION DES LÉSIONS SELON LEUR INTENSITÉ AU NIVEAU DES DIFFÉRENTS ORGANES.....</u>	<u>62</u>
<u>TABLEAU 3.8 : FRÉQUENCE PAR GRADE DES LÉSIONS DÉTECTÉES (%)*.....</u>	<u>64</u>
<u>TABLEAU 3.9 : RÉCAPITULATIF DE L’ANALYSE DU RISQUE RELATIF.....</u>	<u>65</u>

INDEX DES FIGURES

FIGURE 1.1: JUVÉNILE DE <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i>.....	15
FIGURE 1.2 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES INTERACTIONS ENTRE LES DIFFÉRENTS FACTEURS SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER LE DÉVELOPPEMENT D'UNE MALADIE.....	18
FIGURE 1.4: STRUCTURE CHIMIQUE ET PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DU MÉTHYLPARATHION.....	25
FIGURE 2.1: INSTALLATIONS EXPÉRIMENTALES.....	29
FIGURE 2.2 : TECHNIQUE D'INJECTION INTRAMUSCULAIRE DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> AU NIVEAU DU TROISIÈME SEGMENT ABDOMINAL DE <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i>.....	33
FIGURE 2.3 : PRÉPARATION DES CREVETTES POUR L'HISTOLOGIE.....	34
FIGURE 3.1 : SECTION LONGITUDINALE DU MUSCLE ABDOMINAL. SECTION COLORÉE AVEC LE DAPI (4'6-DIAMIDINE-2-PHÉNYLINDOLE), VISUALISÉE EN ÉPI FLUORESCENCE. NOTER LES BULLES D'AIR (B), ET LE TISSU MUSCULAIRE (TM).	49
(x400).....	49
FIGURE 3.2: SECTION LONGITUDINALE DU MUSCLE ABDOMINAL. MÊME SECTION COLORÉE AVEC LE DAPI (4'6-DIAMIDINE-2-PHÉNYLINDOLE), VISUALISÉE AVEC DE LA LUMIÈRE NORMALE.	49
(x400).....	49
FIGURE 3.3: SECTION LONGITUDINALE DU MUSCLE ABDOMINAL, COLORÉE AVEC L'ÉOSINE ET VISUALISÉE EN ÉPI FLUORESCENCE. NOTER QUE DE LA FLUORESCENCE PEUT ÊTRE OBSERVÉE DANS LE TISSU MUSCULAIRE (TM). LA FLUORESCENCE MARQUÉE (BA) EST POTENTIELLEMENT INDICATIVE DE PRÉSENCE DE BACTÉRIES. (x100).....	50
FIGURE 3.4: MÊME SECTION LONGITUDINALE DANS LE MUSCLE ABDOMINAL, COLORÉE AVEC DE L'ÉOSINE, VISUALISÉE AVEC DE LA LUMIÈRE NORMALE. (x100).....	50
FIGURE 3.5: SECTION LONGITUDINALE DE MUSCLE, COLORÉE AVEC LE DAPI (4'6-DIAMIDINE-2-PHÉNYLINDOLE) ET VISUALISÉE EN ÉPI FLUORESCENCE, UTILISANT UN TEMPS D'INCUBATION DE 30 MIN. NOTER QUE LA FLUORESCENCE (BA) EST POTENTIELLEMENT INDICATIVE DE LA PRÉSENCE DE BACTÉRIES (x100).....	52
FIGURE 3.6: MÊME SECTION DE MUSCLE, COLORÉE AVEC LE DAPI À UN GROSSISSEMENT SUPÉRIEUR (x 400)..	52
FIGURE 3.7: MÊME SECTION DU MUSCLE, COLORÉE AVEC LE DAPI À GROSSISSEMENT SUPÉRIEUR. NOTER QU'AUUCUNE PRÉSENCE DE BACTÉRIE NE PEUT ÊTRE CLAIREMENT MISE EN ÉVIDENCE (x 1000).....	52
FIGURE 3.8: MORTALITÉS CUMULÉES DE <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> PENDANT L'EXPOSITION ORALE À 6,48µg ET 19,04µg DE MPAR/G D'ALIMENT.....	54
FIGURE 3.9: ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE L'ACÉTYLCHOLINE ESTÉRASE DES <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> NOURRIES AVEC LES CROQUETTES CONTENANT 19,04µg MPAR/G D'ALIMENT LE PREMIER JOUR DE L'EXPOSITION AU PESTICIDE. (NMOL.MIN-1.MG-1 PROTÉINES).....	55
FIGURE 3.10: MORTALITÉS CUMULÉES DE <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> APRÈS EXPOSITION ORALE À 6,48µg MPAR/G D'ALIMENT ET INJECTION DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i>.....	59
FIGURE 1 : SECTION TRANSVERSALE DE L'HÉPATOPANCRÉAS MONTRANT UNE PÉRIPHÉRIE NORMALE CLASSIFIÉE GRADE "A", NOTER QU'AUUCUNE INFLAMMATION N'EST VISIBLE*.....	96

<u>FIGURE 2. SECTION TRANSVERSALE DE LA PARTIE CENTRALE DE L'HÉPATOPANCRÉAS MONTRANT UNE STRUCTURE NORMALE CLASSIFIÉE GRADE "A", NOTER QU'AUUCUNE INFLAMMATION N'EST VISIBLE*. (x100.).....</u>	<u>96</u>
<u>FIGURE 3. STRUCTURE NORMALE DE LA RÉGION PROXIMALE D'UN TUBULE DE L'HÉPATOPANCRÉAS. REMARQUEZ LES CELLULES R (R), B (B), F (F),BORDURE EN BROsse (BB),ET LUMEN(LU).* (x400).....</u>	<u>96</u>
<u>FIGURE 4. SECTION LONGITUDINALE DE L'HÉPATOPANCRÉAS MONTRANT DE L'INFLAMMATION PÉRIPHÉRIQUE CLASSIFIÉE GRADE "B", NOTER L'INFILTRATION HAEMOCYTAIRE LÉGÈRE ET FOCAL (FLÈCHE NOIRE)*. (x50)...</u>	<u>96</u>
<u>FIGURE 5. SECTION LONGITUDINALE DE LA PARTIE CENTRALE DE L'HÉPATOPANCRÉAS MONTRANT DE L'INFLAMMATION CLASSIFIÉE GRADE "B", NOTER L'INFILTRATION HAEMOCYTAIRE PERI-TUBULAIRE LÉGÈRE (FLÈCHE NOIRE)*. (x100).....</u>	<u>96</u>
<u>FIGURE 6. SECTION LONGITUDINALE DE LA PARTIE CENTRALE DE L'HÉPATOPANCRÉAS MONTRANT DE L'INFLAMMATION CLASSIFIÉE GRADE "C", NOTER L'INFILTRATION HAEMOCYTAIRE CENTRALE (FLÈCHE NOIRE). x100.....</u>	<u>96</u>
<u>FIGURE 10. SECTION LONGITUDINALE DE LA PARTIE CENTRALE DE L'HÉPATOPANCRÉAS MONTRANT LA VACUOLISATION DE CELLULES R CLASSIFIÉE GRADE "A", NOTER L'ABSENCE DE VACUOLISATION DANS LES CELLULES R (R)*. (x100).....</u>	<u>99</u>
<u>FIGURE 11. SECTION LONGITUDINALE DE LA PARTIE CENTRALE DE L'HÉPATOPANCRÉAS MONTRANT LA VACUOLISATION DE CELLULES R CLASSIFIÉ GRADE "B", NOTER LA PRÉSENCE DE VACUOLISATION (V) DANS LES CELLULES R*. (x100).....</u>	<u>99</u>
<u>FIGURE 13. SECTION LONGITUDINALE DE L'HÉPATOPANCRÉAS MONTRANT DES NODULES HAEMOCYTAIRE (NH), NOTER LES CENTRES NÉCROTiques (FLÈCHES NOIRS)*. (x100).....</u>	<u>99</u>
<u>FIGURE 12. SECTION LONGITUDINALE DE LA PARTIE CENTRALE DE L'HÉPATOPANCRÉAS MONTRANT LA VACUOLISATION DE CELLULES R CLASSIFIÉ GRADE "C", NOTER LA PRÉSENCE D'UNE GRANDE QUANTITÉ DE VACUOLES (V) DANS LES CELLULES R*. (x50).....</u>	<u>99</u>
<u>FIGURE 14. SECTION D'UN FAISCEAU MUSCULAIRE MONTRANT DES SIGNES DE LÉGÈRE NÉCROSE MUSCULAIRE (N), GRADE "B", AUCUNE INFILTRATION HAEMOCYTAIRE N'EST VISIBLE, GRADE "A", NOTER QU'AUUCUNE LÉSION À APPARENCE CALCIFIÉE N'EST PRÉSENTE DANS CETTE SECTION*. (x100).....</u>	<u>101</u>
<u>FIGURE 15. SECTION D'UN FAISCEAU MUSCULAIRE MONTRANT UNE INFILTRATION HAEMOCYTAIRE EXTENSIVE (I), GRADE "C" ET DES LÉSIONS À APPARENCE CALCIFIÉE (C) DE GRADE "B". * (x100).....</u>	<u>101</u>
<u>FIGURE 16. D'UN FAISCEAU MUSCULAIRE MONTRANT DE LA NÉCROSE, DE L'INFLAMMATION ET UNE LÉSION À APPARENCE CALCIFIÉE DE GRADE "D". NOTER L'ÉTENDUE DE LA NÉCROSE (N), L'INFLAMMATION (I), ET DE LA LÉSION D'APPARENCE CALCIFIÉE (C)*. (x50).....</u>	<u>101</u>
<u>FIGURE 17. SECTION D'UN FAISCEAU MUSCULAIRE MONTRANT DE LA VACUOLISATION (FLÈCHE NOIR)*. (x50)..</u>	<u>101</u>

TABLE DES ABBREVIATIONS

AChE : Acétylcholinestérase

BHCα: Benzène Hexachloride

BUChE: Butyryl Cholinesterase

CFU: Colony Forming Units ou Unités Formant des Colonies.

DAPI: 4'6-diamidine-2-phenylindole

DDE: DichloroDiphénylDichloroEthylène

DDT: DichloroDiphénylTrichloroEthane

DL: Degré de Liberté

DO: Densité optique

DTAF: 5-[4,6-Dichlorotriazin-2-YL] amino fluorescéine

FAO: Food and Agriculture Organisation

GFP: Green Fluorescent Protein

IC: Intervalle de confiance

MT: Metric Tonnes

MPAR: Méthylparathion

NH: Nodule Haemocytaire

PCB: Polycorinated Biphenyls

PBS: Phosphate Buffer Sterile ou tampon phosphate stérile

RR: Risque Relatif

TCB: Tryptic Caseine Broth

TIAC: Toxi Infection Alimentaire Collective

tpm: tours par minutes

TSB: Tryptic Soya Broth

V: Vibrio

1.Introduction

1.1. Production mondiale de crevettes.

Les crevettes sont majoritairement produites par leur capture en milieu sauvage (pêche), mais également par leur production en captivité (aquaculture). La production des crevettes (pêche et aquaculture confondues) a augmenté de façon considérable de 1990 (2,6 millions MT) à 1998 (3,8 millions MT) (FAO, 2001). L'Asie est responsable de la plus grande partie de la production mondiale de crevettes. En 1998, avec une production de 970 000 MT, la Chine avait une production qui représentait 25% de la production mondiale. La production mondiale de crevettes dépasse aujourd'hui les 8,65 millions MT par an et rapporte plus de 4 milliards de dollars américains (Rosenberry, 2001).

Il résulte de ces observations que la production mondiale de crevettes connaît une croissance fulgurante.

Voyons à présent quelles sont les contributions relatives de la pêche et de l'aquaculture dans cette production.

1.1.1. Contribution de la pêche à la production mondiale de crevettes.

La pêche constitue toujours une part importante de la production mondiale. Certains pays ont vu leurs pêcheries de crevettes augmenter. Par exemple, de 1987 à 1997 la Chine a vu sa production de pêche passer de 300 000 MT à 730 000 MT. Par contre, dans d'autres pays, la pêche à la crevette reste constante. En Inde par exemple, elle s'est stabilisée à 250 000 MT depuis plusieurs années, en Indonésie, à 200 000 MT (Josupeit, 1999). La demande mondiale est pourtant toujours croissante. La pêche à la crevette ayant atteint ses limites dans de nombreuses régions du monde, l'aquaculture va devenir une activité prépondérante .

1.1.2. Contribution de l'aquaculture à la production mondiale de crevettes.

La FAO (2001) rapporte une stabilisation de la production mondiale aquacole de crevettes autour de 800 000 MT dans les années 1990, après une rapide croissance dans la fin des années 1980. Cette stabilisation s'explique par l'apparition d'épidémies dévastatrices dans la plupart des pays producteurs, en Chine (1993), en Thaïlande (1996 et 1997) et en Equateur plus récemment (1999) (FAO, 2001). Ainsi, la production aquacole mondiale de crevettes a même connu un déclin de 3% en 1999.

La part relative de l'aquaculture n'en est pas pour autant négligeable. En effet, en 1998, 21% de la production totale de crevettes était issue de l'aquaculture. Dans certains pays la production des crevettes par l'aquaculture excède ainsi le nombre de crevettes produites par la pêche. En Thaïlande, par exemple, l'aquaculture représentait plus de la moitié de la production thaïlandaise en 1998. (FAO, 2001). L'aquaculture de la crevette en Amérique du sud a récemment souffert d'un problème d'épidémie virale, le White Spot Syndrom Virus (WSSV) ayant dévasté la plupart des fermes de crevettes en Equateur. Ainsi, les pays asiatiques tels que la Chine, la Thaïlande et l'Indonésie ont récupéré une part importante des marchés d'exportation de la crevette vers l'Europe et les Etats-Unis, part jadis tenue par les pays d'Amérique Latine (FAO, 2001).

1.1.3. Place du Mexique, Sinaloa.

Au Mexique, où la présente étude a été faite, la production aquacole de crevettes est une pratique relativement récente. Elle s'est développée dans les régions côtières, aux environs des estuaires et lagons. C'est en 1985, lorsque les autorités mexicaines ont encouragé le développement de fermes de crevettes, que cette production a commencé à se développer. Ce n'est qu'en 1988 qu'elle est devenue une part importante de l'économie du pays. Depuis, une croissance modérée mais continue de la production mexicaine a pu être observée au fil des années . En 1988, la production de crevettes atteignait 6810 MT (Advances in World Aquaculture, 1991). L'état de Sinaloa était alors le principal producteur du pays (tableau 1.1).

Tableau 1.1: Capacité de production en MT en 1988 des fermes de crevettes au Mexique.

Etat	Capacité de Production (MT/an)
Baja California	90
Baja california sur	61
Campeche	36
Chiapas	54
Jalisco	11
Nayarit	349
Sinaloa	5493
Sonora	436
Tamaulipas	280
TOTALE	6810

Récemment, l'état de Sonora a pris la place de Sinaloa en devenant le principal état producteur de crevettes du Mexique avec une production de 12 500 MT en 1999 (Rosenberry, 2001).

1.1.4. Importance de *Litopenaeus vannamei* au Mexique.

Penaeus californiensis, *P. stylirostris* et *Litopenaeus vannamei* sont les trois espèces les plus utilisées en aquaculture. Parmi celles-ci, c'est la crevette blanche, *Litopenaeus vannamei* qui est la plus utilisée des trois (Advances in World Aquaculture, 1991). Le tableau 1.2 montre les principales espèces élevées au Mexique état par état et par région côtière.

Tableau 1.2: Principales espèces de crevettes marines produites au Mexique par état et région côtière.
(Dirección General de Acuacultura, dans Advances in World Aquaculture, 1991)

Espèces cultivées		
	Nom scientifique	Nom commun
Côte pacifique		
Baja California	<i>P. stylirostris</i>	Crevette bleue
Baja California sur	<i>P. stylirostris</i>	Crevette bleue
	<i>P. californiensis</i>	Crevette brune
Chiapas	<i>L. vannamei</i>	Crevette blanche
Jalisco	<i>L. vannamei</i>	Crevette blanche
Nayarit	<i>L. vannamei</i>	Crevette blanche
Sinaloa	<i>L. vannamei</i>	Crevette blanche
	<i>P. stylirostris</i>	Crevette bleue
Sonora	<i>P. stylirostris</i>	Crevette bleue
	<i>L. vannamei</i>	Crevette blanche
Côte du Golfe de Mexique		
Tamaulipas	<i>L. vannamei</i>	Crevette blanche
	<i>P. aztecus</i>	Crevette brune
Campeche	<i>L. vannamei</i>	Crevette blanche

La crevette blanche *L. vannamei* (figure 1.1) est une espèce tropicale distribuée géographiquement depuis Sonora Mexico jusqu'au Nord du Pérou. Ce décapode est cultivé aussi bien en culture extensive, intensive que semi intensive. Il est avec *Litopenaeus stylirostris* l'espèce la plus populaire dans l'aquaculture du Mexique et d'Amérique du Sud .



Figure 1.1: Juvénile de *Litopenaeus vannamei*.
(Betancourt-Lozano, 1999).

Précédemment, nous avons pu voir le poids respectif de la pêche et de l'élevage de la crevette. Il est évident que, dans tous les grands pays producteurs, l'apparition de maladies est resté un frein au développement des élevages intensifs. Il est donc judicieux de s'interroger sur l'origine et l'épidémiologie des maladies affectant les crevettes.

1.2. Les maladies affectant les crevettes et leur origine.

Une maladie peut être définie comme toute anomalie structurale ou fonctionnelle d'un animal. Cette définition inclut non seulement les maladies infectieuses mais aussi des problèmes de type environnemental et nutritionnel. Souvent, la maladie est le résultat d'une combinaison de facteurs. Ainsi, les maladies infectieuses ne sont pas simplement dues à la présence d'une bactérie ou d'un virus (Chanratchakool, Turnbull, Funge-Smith, Mac Rae, Limsuwan, 1998).

1.2.1. Facteurs influençant la sensibilité aux maladies.

1.2.1.1. L'efficacité du système immunitaire de l'hôte.

Le système immunitaire des crustacés est uniquement non spécifique et comprend plusieurs types de réponse. Leur cuticule ou carapace et leur microflore endogène sont les premières lignes de défense. D'autre part, leurs haémocytes¹ sont dotés de propriétés immunitaires. Ils ont en effet des capacités de phagocytose, encapsulation, formation de nodules, et de libération de substances chimiques cytotoxiques.

1 : Les seules cellules de la circulation sanguine des crustacées sont les haémocytes, cellules pouvant se présenter sous trois formes ; granulocytes, semi-granulocytes et cellules hyalines.

Une fois qu'un pathogène a réussi à franchir la barrière physico-chimique de la cuticule, la phagocytose est la réaction de défense la plus courante. Lorsque la cavité corporelle est envahie par un trop grand nombre de micro-organismes, la capacité de phagocytose est saturée. La formation de nodules haemocytaires et des phénomènes d'agglutination cellulaire prennent alors le relais. La réponse humorale inclut des facteurs comme le système d'activation de la prophénoloxydase (proPO) ainsi que des facteurs associés tels que la mélanine, les lysines, les lysosymes, et d'autres substances bactéricides issues de l'haemolymph (Soderhall et Cerenius, 1992). Mais la mélanisation est la réponse immunitaire ultime des crustacés. Le mécanisme simplifié en est le suivant : le système de la proPO, localisé dans les haemocytes granulaires, est libéré dans le plasma par un stimulus microbien. La proPO est activée par un autre système calcium-dépendant, le PPAE ou proPO activating system. Il s'agit d'une protéinase de type sérine qui coupe la proPO, produisant un peptide de 7-Kda et de la phényloxydase. Cette dernière catalyse la réaction initiale de la mélanisation (Vargas-Albores et Yepiz-Plascencia, 1998).

Tout facteur qui interfère avec le système immunitaire est susceptible d'augmenter la sensibilité aux infections.

1.2.1.2. Les paramètres environnementaux susceptibles de causer un stress.

Les animaux aquatiques vivent en équilibre avec leur environnement. Comme cette relation avec l'environnement est extrêmement fragile, la variation d'un ou plusieurs facteurs du milieu est susceptible de causer un stress. Le stress peut être défini comme « un état produit par l'environnement ou par d'autres facteurs qui dépasse les capacités d'adaptation normales de l'animal ou qui en perturbe le fonctionnement normal à un tel point que ses chances de survie sont significativement réduites » (Brett, 1957). Une nutrition inappropriée, des traitements chimiques, la manipulation et un bouleversement de la hiérarchie sociale peuvent tous être des facteurs de stress. Par exemple, Le Moullac (1998) a montré que l'hypoxie sévère (1 mg O₂/ml) augmente la mortalité chez *Penaeus stylirostris* après injection de *vibrio*. De la même façon, les paramètres environnementaux comme la pollution sont susceptibles d'induire un stress. Il a été démontré que des polluants, comme les métaux lourds, étaient capables d'altérer la régénération normale des membres ainsi que la mue chez les crustacés. Hebel *et al.*, ont également démontré que le cuivre était capable d'induire des altérations dans les réponses comportementales telles que les réactions d'évitement, ainsi que des

changements dans le comportement de la nutrition et de l'accouplement chez le crabe *Carcinus maenas* .

L'utilisation abusive de pesticides est souvent la cause de pollution environnementale dans les régions côtières. Dans la baie d'Ohuira, par exemple, un lagon côtier du golfe de Californie, on peut détecter des pesticides à usage restreint par la loi et des pesticides interdits (aldrine, endrine, méthylparathion, DDT et lindane) . Tous ces paramètres environnementaux sont susceptibles de stresser les crevettes, les rendant ainsi plus vulnérables aux pathogènes présents dans le milieu.

1.2.1.3. L'interaction entre pathogènes et maladie.

En milieu aquatique, comme en milieu terrestre, les pathogènes peuvent être des virus, des bactéries, des champignons, des protozoaires et des métazoaires. La différence est qu'en milieu aquatique, l'accès à l'hôte est facilité par l'eau. De plus, dans la plupart des élevages aquatiques, les hôtes sont concentrés et la transmission de pathogènes facilitée. Les relations pouvant exister entre l'hôte et ses pathogènes sont complexes.

Chez les crevettes, il y a peu de pathogènes stricts. La plupart sont des pathogènes opportunistes. Ceci implique qu'il n'y a pas équivalence entre la maladie et la présence du pathogène. Pour que la maladie se déclare, il faut en plus un facteur de stress.

Les bactéries du genre *Vibrio* sont un exemple de pathogène opportuniste des crevettes qui se développe sur des animaux affaiblis ou stressés (Chanratchakool, 1998; Lightner, 1993). L'action indépendante du pathogène opportuniste ou du stress environnemental ne conduit pas à la maladie. Pour comprendre les pathologies affectant les crevettes, il faut donc considérer l'interaction entre l'environnement, l'hôte et le pathogène.

1.2.2. Les interactions entre l'hôte, son environnement et les pathogènes.

Il est largement accepté que les maladies infectieuses en milieu aquatique résultent d'une combinaison entre la sensibilité de l'hôte et un environnement défavorable contenant un pathogène potentiel. Cette interaction est schématiquement représentée dans la figure 1.2 (Sniesko, 1974).

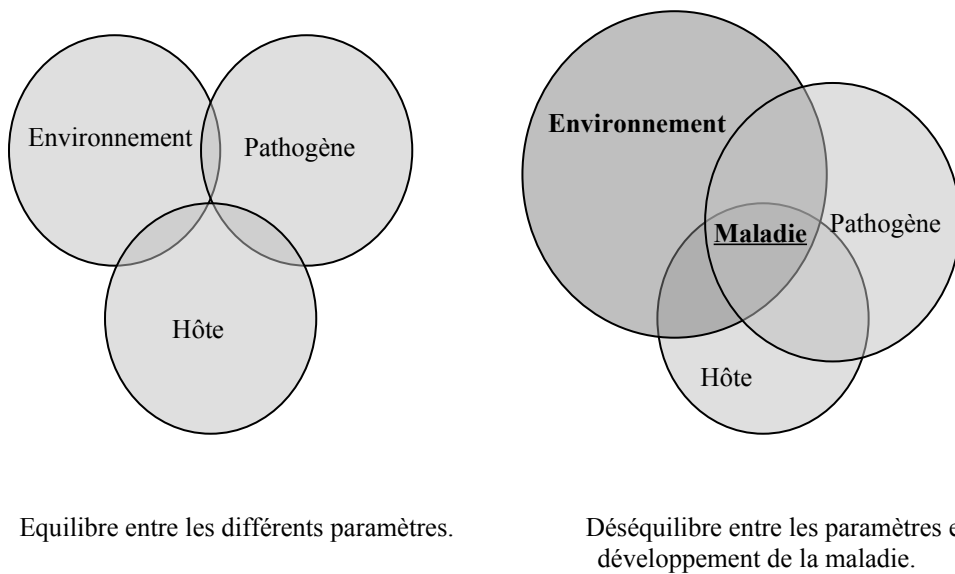


Figure 1.2 : Représentation schématique des interactions entre les différents facteurs susceptibles d’influencer le développement d’une maladie.

La présence d’un pathogène chez une crevette n’implique pas obligatoirement que l’animal souffre d’une maladie. Pour que celle-ci se développe, il faut en plus des conditions environnementales défavorisantes entraînant un affaiblissement et une baisse d’immunité de l’animal (Chanratchakool, 1998). Ainsi, un stress environnemental, dû par exemple à une pollution par des pesticides, peut favoriser le développement d’une maladie causée par un pathogène opportuniste comme *Vibrio* spp.

1.3. *Vibrio* spp. ; un pathogène opportuniste.

1.3.1. Présentation générale de *Vibrio* spp.

Le genre *Vibrio* est un bon exemple de pathogène opportuniste présent dans l’eau de mer et l’eau saumâtre des régions côtières. Couch (1978) considère ce type d’environnement comme un “bouillon de culture de bactéries Gramme négatives” où l’on est susceptible de rencontrer très fréquemment des *Vibrio* spp. sur les organismes vivants. Williams et La Rock (1985) ont répertorié durant un an la flore bactérienne des sédiments. Ils ont souligné la présence de quatre espèces de *vibrio* (*V.fluvialis*, *V.parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. alginolyticus*). De même, des échantillons collectés à partir de divers milieux (eau de mer, de bassin, et de source) et de différents types d’organismes aquatiques, tels que des crabes et crevettes, ont montré que 79.3% des crustacés sont porteurs de *Vibrio parahaemolyticus* (Lall *et al.*, 1979).

Différentes études bactériologiques sur les crevettes ont montré la présence de *Vibrio* spp aussi bien sur des animaux sains que malades. Treize espèces différentes de *Vibrio* ont été isolées à partir de crevettes (*L. vannamei*) saines ou malades provenant d'élevages ou d'écloseries mexicaines ou équatoriennes . De la même façon, plus de dix espèces de *Vibrio* ont été isolées sur des crevettes (*L. vannamei*) saines .

A cause de leur caractère opportuniste, de leur large distribution et de leur pathogénicité variable, il est extrêmement difficile de conclure si l'isolement d'une espèce de *Vibrio* est à l'origine d'une affection. Nous l'avons vu, un affaiblissement ou un dommage causé à l'animal est nécessaire pour le développement de vibriose (Chanratchakool *et al.*, 1998). Pour certaines souches de *Vibrio* néanmoins, il suffit de très peu de dommages sur l'animal pour entraîner le développement de la maladie (Chanratchakool *et al.*, 1998). Considérons à présent l'importance de cette maladie en élevage.

1.3.2. Importance de la vibriose en élevage de crevettes.

Le terme de vibriose est utilisé pour les infections causées par des bactéries du genre *Vibrio*. Il a été estimé que les pertes annuelles de poissons cultivés au Japon dues à cette maladie excèdent les 30 millions de dollars américains (Nelson, 1999). En élevage de crevettes, les infections dues à des *Vibrio* spp. sont probablement la forme de maladie la plus courante (Chanratchakool *et al.*, 1998).

La vibriose a une répartition mondiale. Tous les types d'élevages de crevettes peuvent être touchés, mais ce sont les écloseries qui le sont le plus fréquemment. Les élevages pratiquant le grossissement en bassins sont également beaucoup touchés par des épizooties de vibriose (Lightner, 1996). Dans des conditions de stress, toutes les crevettes cultivées sont susceptibles de développer la vibriose. Des incidents majeurs de vibriose ont été rapportés dans les différentes espèces cultivées de crevettes telles que *P. japonicus* au Japon, *P. monodon* en Asie du sud-est, et *L. vannamei* en Equateur, au Pérou, en Colombie, et en Amérique Centrale (Lightner, 1996).

Ainsi, la vibriose est considérée comme un problème économique majeur par l'industrie de la crevette. Les agents étiologiques les plus fréquemment isolés sur des crevettes atteintes de vibriose sont *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, and *V. parahaemolyticus* (Lightner, 1988).

En Amérique latine, la vibriose systémique est aussi appelée « Sea Gull Syndrome » ou « Sindroma de Gaviota ». Lightner (1996) a montré que *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. harveyi* sont les espèces les plus fréquemment impliquées dans le sea gull syndrome chez *L. vannamei*.

1.3.3. Caractéristiques générales de *Vibrio parahaemolyticus*.

Parmi les nombreuses espèces de *Vibrio* pouvant affecter les crevettes du genre *Penaeus*, *V. parahaemolyticus* apparaît comme un pathogène majeur (Sudheesh et XU, 2001). Cette bactérie a été découverte pour la première fois en 1950 lors d'un épisode de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) à Osaka au Japon. Aujourd'hui, c'est le pathogène le plus fréquemment rencontré dans la nourriture de Taiwan, du Japon et d'autres régions côtières asiatiques. L'incidence importante de ce pathogène est sans doute due à la consommation importante d'organismes aquatiques dans ces régions .

V. parahaemolyticus est une bactérie halophile, gramme négative, mobile, ayant une forme de bâtonnet droit ou incurvé. Elle est catalase et oxydase positive et réduit les nitrates. Sa croissance est facile sur des milieux non sélectifs de 37°C à 42-43°C. Elle tolère des concentrations en chlorure de sodium (NaCl) de 3%, 6% et 8%. Cependant, elle ne résiste pas à une absence de sel ou à des concentrations supérieures à 10% en NaCl (Cowan et Steel, 1993).

1.3.4. Diagnostic de la vibriose.

1.3.4.1. Diagnostic général.

Signes cliniques.

Les signes cliniques d'importance diagnostique sont une mortalité élevée, spécialement pour les stades post-larvaires et juvéniles. Des animaux moribonds souffrent d'hypoxie et sont observables à la surface de l'eau et sur les bords des bassins de production. Ce comportement attire les oiseaux sauvages, d'où le nom de Sea Gull Syndrome donné à cette maladie en Amérique Latine. (le Sea Gull est un oiseau côtier marin). La présence de crevettes luminescentes a également été rapportée chez des juvéniles de *P. monodon* par Lavilla-Pitogo *et al.*, (1998). Ils expliquent ce phénomène par les propriétés luminescentes de certaines souches de *vibrio*.

Diagnostic présomptif.

La présence des signes cliniques ainsi que l'isolement en grand nombre de bactéries du genre *vibrio* dans l'haémolymphe peuvent être des éléments suffisants pour établir un diagnostic présomptif.

Diagnostic histologique.

La vibriose peut être détectée par examen histologique. Les techniques courantes de diagnostic histopathologique ont été décrites par Lightner (1996). La confirmation du diagnostic histologique se fait par la bactériologie et/ou des tests sérologiques (Anticorps spécifiques, utilisation de sondes ADN ou par PCR). Les lésions typiques décrites par Lightner (1996) sont différentes selon que l'on s'intéresse à des formes localisées ou systémiques de la maladie :

- Dans la vibriose localisée, initialement induite par des lésions cuticulaires, la maladie se manifeste par des lésions focales ou multi-focales de mélanisation cuticulaire et sous-cuticulaire.
- Dans la vibriose systémique, (Sea Gull Syndrome ou Sindroma de Gaviota), des nodules haemocytaires multi-focaux mélanisés ou non mélanisés contiennent les bactéries. Ces centres septiques sont les principales lésions diagnostiques. Les nodules sont le plus fréquemment localisés dans l'organe lymphoïde, le cœur, et les branchies. Ils peuvent également se trouver un peu partout dans l'organisme au sein des sinus de l'haémocoele et dans le tissu connectif lâche.

1.3.4.2. L'interprétation du diagnostic.

L'isolement de *Vibrio* spp à partir de crevettes moribondes ne permet pas en-soi d'expliquer la maladie. Pour expliquer le déclenchement de la maladie, il est important de considérer non seulement l'agent pathogène, mais aussi les paramètres environnementaux ayant pu affaiblir les crevettes pour les rendre plus vulnérables aux *Vibrio* spp. La pollution de l'eau est un facteur pouvant affaiblir et stresser les crevettes. Par exemple, Couch et Courtney, (1977) ont montré que l'exposition de crevettes porteuses saines de *Baculovirus*, à une concentration de 1-3 ppb de PCB pendant 10-25 jours, entraînait une augmentation de l'intensité de l'infection.

1.4. La pollution côtière par les pesticides agricoles.

1.4.1. Sources de pollution.

La pollution des eaux dans les régions côtières peut être la conséquence d'activités humaines ou agricoles ayant lieu dans les plaines bordant la côte. Divers types d'effluents peuvent être mis en cause comme les vidanges, les décharges industrielles, les effluents agricoles et les déchets provenant d'autres activités aquacoles.

Les activités agricoles occasionnent une pollution importante des eaux côtières. Parmi les composés libérés, on peut citer les fertilisants, les fongicides, et les pesticides comme les organophosphorés et organochlorés .

1.4.2. Pollution côtière au Mexique.

La pollution agricole au Mexique est généralement associée à la côte nord-ouest du pays où se situent 1728 868 ha de terres irriguées (Anonyme, 1991). La figure 1.3 montre les régions où un conflit existe entre l'activité aquacole et les activités terrestres et agricoles à cause de problèmes de pollution de l'eau.

Par exemple, dans une étude d'une durée d'un an, il a été détecté dans la baie d'Ohuira (Sinaloa) la présence de pesticides à usage réglementé ou prohibé . Le tableau 1.3 montre quelques exemples de résidus de pesticides détectés dans l'eau, les sédiments et les crevettes trouvés dans cette région côtière .

Tableau 1.3 : Exemples de résidus de pesticides détectés dans la baie d'Ohuira, Sinaloa dans une étude effectuée du 15 décembre 1997-29 septembre 1998

Echantillon	Pesticide détecté	Concentration (µg/L)
Eau	Endosulfane	0,0973
	BHCα	0,0928
	Parathion	0,0173
	Malathion	0,0125
	Aldrine	0,0092
	Diméthioate	0,552
	Méthylparathion	0,0166
Sédiments	Dieldrine	0,0421
	Disulfon	1,3800-17,9
	Lindane	0,0890
	Parathion	0,0193
	Aldrine	0,0271
	Chlorpyrifos	0,1944
Crevettes	Endosulfane sulfate	0,1068
	Heptachlore	0,0196
	Aldrine	0,0026
	DDE	0,0021

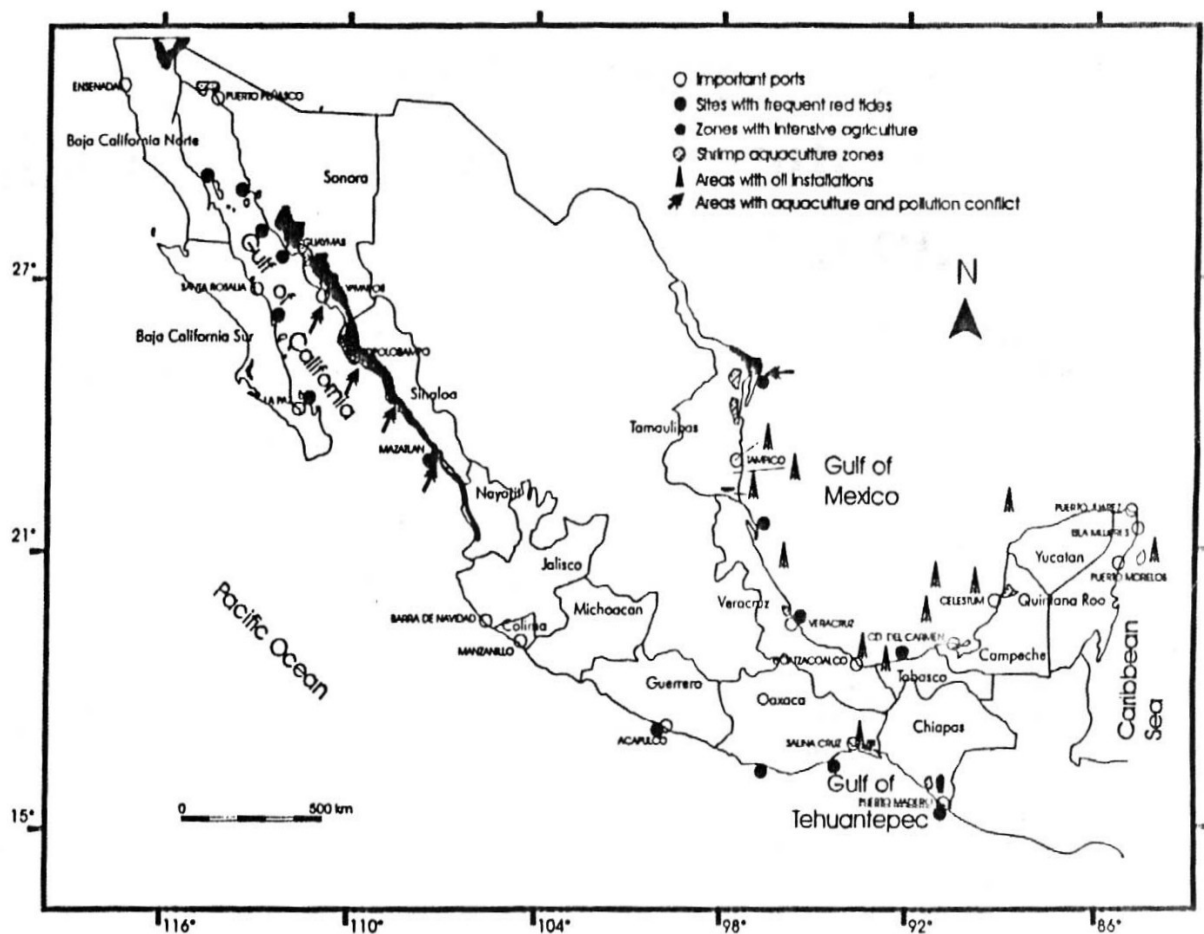


Figure 1.3: Les sites d'activités aquacoles et les régions menacées par la pollution de l'eau au Mexique.

(Paez-Osuna, 1998)

Les pesticides de “nouvelle génération” comme les organophosphorés sont utilisés de façon importante dans l’agriculture tropicale. En Amérique centrale, les organophosphorés les plus utilisés sont le malathion, le parathion, le monocrotophos, et le clorpyrifos (Mee *et al.*, 1991). Au Mexique, certains de ces produits seraient utilisés à des concentrations et à des fréquences telles qu’ils pourraient avoir un impact potentiel sur l’écosystème tropical marin . Il est donc judicieux de se demander l’effet de ces polluants sur des organismes non cibles, tels que les crevettes d’élevage.

1.4.3. Les organophosphorés.

Les organophosphorés sont utilisés principalement comme insecticides. Depuis les vingt dernières années, ils ont avec les carbamates et les pyréthrinoïdes largement remplacé les pesticides persistants de type organochlorés comme le DDT et la dieldrine. Par rapport à ces derniers, les organophosphorés sont généralement plus toxiques mais se dégradent plus rapidement dans l'environnement. Le méthylparathion est un des plus utilisés.

1.4.3.1. Le méthylparathion : propriétés et usages.

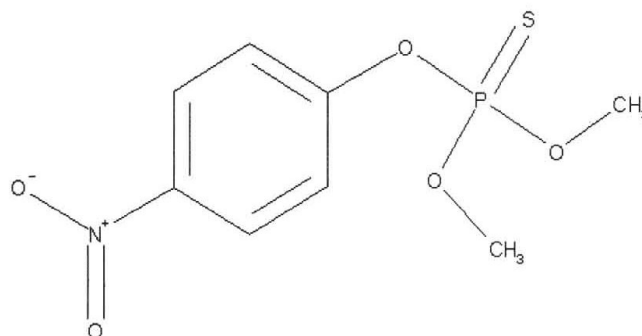
Le méthylparathion est un insecticide et acaricide organophosphoré utilisé pour contrôler l'anthrome et d'autres insectes piqueurs et suceurs nuisibles (Hertel, 1993). Il agit par contact ainsi qu'après absorption ou inhalation. Les organophosphorés bloquent l'activité de la choline-esterase, une enzyme essentielle du système nerveux des invertébrés et des vertébrés (Hertel, 1993).

Une indication de l'utilisation du méthylparathion dans différentes régions du monde en tonnes est donnée par le tableau 1.4.

Tableau 1.4 : La consommation de méthylparathion en tonnes dans différentes régions du monde.
(Bayer, 1988) dans Hertel, 1993

Région	1984	1985	1986
Afrique	191	308	152
Amérique du Nord	2045	2776	2932
Amérique du Sud	9135	6555	5587
Asie, Nouvelle Zélande, Australie	2757	3028	2620
Europe de L'Ouest	894	1087	1019
Total	15022	13754	12310

Les caractéristiques générales du méthylparathion sont indiquées dans la figure 1.4.



Nom	Méthylparathion
Classe chimique	Pesticide Organophosphoré
Formule	(C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS)
Poids moléculaire	263,23
Température de décomposition	100°C
Dégradation dans l'eau de mer	100% de dégradation en 2 semaines ou plus

Figure 1.4: Structure chimique et propriétés générales du méthylparathion.

(EXTONET, Cornell University, 2001)

Le méthylparathion (C₈H₁₀NO₅PS) a été synthétisé pour la première fois en 1940. Il est inflammable à 46°C et s'hydrolyse plus rapidement dans des solutions alcalines (pH 8,5) que des solutions neutres (pH 7,0) ou acides (pH 0,5). Le méthylparathion est relativement insoluble dans l'eau mais est soluble dans la plupart des solvants organiques (Badawy et El-Dib, 1984; Hertel, 1993). Il est beaucoup plus stable dans de l'eau salée, comme l'eau de mer (salinité 32-35‰), que dans l'eau douce (Badawy et El-Dib, 1984). Son temps de demi-vie dans les sédiments est de 11 à 13 semaines, dans un environnement alcalin ayant un pH de 9 à 25°C. Le temps de demi-vie du méthylparathion par dégradation bactérienne (10⁷ organismes/L) est de 9 semaines.

Il existe différentes voies de dégradation du méthylparathion les principales étant la photodégradation, l'hydrolyse chimique et la biodégradation. Lorsqu'il est exposé à une source lumineuse, le méthylparathion subit une dégradation oxydative qui réduit son temps de demi-vie. a rapporté que le temps de demi-vie pour une solution de 1 mg/L de méthylparathion maintenue dans l'obscurité est de 18 jours. Ce temps n'est plus que de 6,3 jours si la même solution est exposée à la lumière du jour. Dans l'environnement aquatique, il existe une autre voie de dégradation du méthylparathion : il s'agit d'une dégradation par hydrolyse chimique. Cette voie ne joue qu'un rôle minoritaire dans la dégradation du

méthylparathion (Hertel, 1993). Lorsque le milieu aquatique est eutrophique, la biodégradation est la voie de dégradation la plus importante. Si l'environnement est oligotrophique, ce sont l'adsorption, la photolyse et l'hydrolyse qui sont les voies majoritaires de dégradation (Hertel, 1993).

1.4.3.2. Mode d'action.

Le méthylparathion agit en inhibant l'activité acétylcholinestérasique (AChE). La forme toxique du méthylparathion est en fait le méthylparaaxon. Cette forme toxique du méthylparathion s'obtient après désulfuration oxydative par des mono-oxygénases comme le cytochrome P450 (Hertel, 1993).

L'acétylcholinestérase est un B estérase. Les estérases de type B incluent les cholinestérases (acétyl and butyryl), les estérases neuro-toxiques et carboxylestérases. Ces estérases de type B sont inhibées par les organophosphorés et, contrairement aux estérases du type A, la régénération de l'enzyme libre par déphosphorylation est lente. L'inhibition des estérases de type B s'effectue par la réaction de l'organophosphoré avec la sérine au site actif de l'enzyme. L'inhibition causée par les organophosphorés est considérée comme biologiquement irréversible (Peakhall, 1992).

L'acétylcholine est libérée aux extrémités nerveuses cholinergiques en réponse à un stimulus nerveux (Hertel, 1993). L'inhibition de l'AChE cause une accumulation d'acétylcholine au niveau de l'espace synaptique, causant ainsi une perturbation de la fonction nerveuse. Cette inhibition peut être mesurée, et est utilisée comme un bio-marqueur pour mesurer l'effet du méthylparathion sur les organismes cibles et non cibles .

1.4.3.3. La toxicité des organophosphorés pour les crustacées.

A la dose de 5 ppb pendant 10 jours, le méthylparathion entraîne une augmentation de la mortalité sur *P. monodon* et de multiples malformations chez les crevettes survivantes (Flegel *et al.*, 1992). Parmi les malformations observées, on note un élargissement et la vacuolisation des ganglions nerveux ventraux ainsi qu'une nécrose générale de l'hépatopancréas et des muscles squelettiques.

A la dose de 2 ppb pendant 96h, on observe une diminution significative du pourcentage de phagocytose *in vitro* ainsi qu'une réduction du nombre d'haémocytes circulant chez les crevettes exposées (Bodhipaksha et Perkins, 1999).

De la même façon, ont exposé *Metapenaeus monoceros* pendant 12h à des concentrations de 40 ppb de méthylparathion et de malathion montrant ainsi que les activités acétylcholinestérasique (AChE), butyryl-cholinestérasique (BUChE) et glutaminasique des tissus nerveux étaient significativement inhibées.

1.5. Objectifs de l'étude.

Le but général de cette étude est d'évaluer expérimentalement l'effet du méthylparathion par exposition orale sur le développement de vibriose chez la crevette blanche *L. vannamei* ayant subi une infection d'épreuve avec *V. parahaemolyticus*.

Concrètement, nous avons cherché à :

- développer une technique de coloration pour visualiser la progression des bactéries injectées,
- déterminer une dose sub-létale du pesticide à inclure dans la nourriture,
- déterminer l'effet du pesticide par mesure de l'activité acétylcholinestérasique,
- évaluer l'interaction entre le pesticide et la bactérie en utilisant le comptage des mortalités et l'histologie.

2. Matériels et méthodes.

Deux expériences préliminaires ont été menées afin d'évaluer différentes techniques de coloration des tissus permettant de visualiser simultanément sur les sections histologiques les tissus et les bactéries préalablement marquées à la fluorescence et de déterminer la dose toxique sub-létale du méthylparathion chez la crevette blanche.

Dans l'expérience finale, l'interaction du méthylparathion avec l'injection de *Vibrio* a été étudiée. Les animaux ont reçu le méthylparathion par voie orale, mélangé à leur nourriture. *Vibrio parahaemolyticus* a été administré par injection. Les animaux survivants ont finalement été sacrifiés et préparés pour l'histologie.

2.1. Généralités.

2.1.1. Origine et prise en charge des *Litopenaeus vannamei*.

Les animaux ont été achetés dans une ferme commerciale de crevettes de Sinaloa (Mexique). Elles sont arrivées trois semaines avant le début de l'expérience avec un poids moyen de $0,8 \text{ g} \pm 0,2$ et ont été acclimatées dans les bassins réservés à cet usage.

Avant le début de l'expérience, les animaux ont été maintenus dans dix réservoirs en plastique de 500L (ROTOPLAS) connectés à un système de re-circulation de l'eau. La salinité et la température ont été mesurées de manière hebdomadaire. Les crevettes ont été nourries une fois par jour à volonté avec une formule commerciale (Aquatone, Mexico) composée de 40% de protéines, 3,5% de lipides, 3,0% de fibres, 16,0% de cendres, et 12,0% d'eau.

2.1.2. Système expérimental.

2.1.2.1. Les installations expérimentales.

Localisation

La pièce dans laquelle les expériences ont été effectuées a été maintenue à une température constante de $26,3^{\circ}\text{C} \pm 0,4$ et a reçu une photopériode de 12h de lumière et 12h d'obscurité (figure 2.1). Des aquariums en verre ont été utilisés, ceux-ci ont été individuellement aérés par l'intermédiaire de tuyaux connectés à une pompe à air (1,5 HP air blower). Des aquariums de 30l ont été utilisés pour la première étude préliminaire, et de 10L pour les expériences suivantes.



Figure 2.1: Installations expérimentales

Les paramètres de l'eau

L'alimentation en eau de mer du laboratoire provenait d'un forage situé à 500 mètres de la côte, et filtré à 20 microns. Dans toutes les expériences, les paramètres suivants ont été mesurés de façon journalière. La température était mesurée avec un thermomètre à mercure d'échelle -30°C $+50^{\circ}\text{C}$, (BrannanTM, Angleterre). La salinité était mesurée en utilisant un réfractomètre manuel (AtagoTM, Japon). L'oxygène était mesuré avec un oxygénomètre de modèle YSI 95 (USA).

Durant toutes les expériences mettant en contact les animaux avec le méthylparation, l'eau des aquariums a été changée deux fois par jour après la période d'alimentation afin d'éliminer les fèces et les croquettes non mangées. Les aquariums étaient siphonnés à l'aide d'un tuyau en plastique de 2,5 cm de diamètre terminé par un tube en verre de 25 cm de long. L'intégralité de l'eau des aquariums pouvait ainsi être siphonnée 30 minutes après le début du repas. Après siphonnage de chaque aquarium, le siphon était rincé avec de l'eau, désinfecté avec de l'alcool puis rincé à l'eau distillée. L'eau des aquariums était ensuite renouvelée à partir d'un réservoir (ROTOPLAS) noir de 460L. L'eau du réservoir était aérée, et y avait séjourné 24 heures de manière à avoir atteint l'équilibre thermique de la pièce.

2.1.2.2. Les animaux.

Avant le début de chaque expérience, les animaux ont été acclimatés pendant 3 ou 4 jours. Durant cette période, les crevettes ont reçu une alimentation sans pesticide à partir des croquettes commerciales décrites dans la section 2.1.2.2. (Aquature, 40% de protéines, CENZONE)

Dans les études préliminaires, des juvéniles *Litopenaeus vannamei* de $0,75 \text{ g} \pm 0,19 \text{ g}$ de poids frais ont été distribués de façon aléatoire dans les différents aquariums.

Dans l'expérience finale, les animaux utilisés ont été des juvéniles de $0,85 \text{ g} \pm 0,4 \text{ g}$ de poids frais. La quantité d'aquariums et d'animaux utilisés dans chaque expérience est décrite dans les sections (2.2.1, 2.2.2, et 2.3).

Pour les expériences faisant intervenir le méthylparathion, les crevettes ont été soumises à un jeûne de 24 heures avant le début du traitement afin de maximiser l'ingestion de la nourriture contenant le pesticide.

2.1.3. L'alimentation

Dans la première expérience préliminaire, les crevettes ont été nourries une fois par jour avec une alimentation normale.

Dans l'expérience visant à déterminer la concentration toxique sub-létale, du méthylparathion (TECKHEM, Mexico), différentes solutions du pesticide dans de l'acétonitrile (OMNISOLV AXO142-1, EM Science) ont été réalisées : $2,7\mu\text{g}$, $4,04\mu\text{g}$, $5,66\mu\text{g}$, $6,48\mu\text{g}$ et $19,06\mu\text{g}$ de méthylparathion par g de croquettes.

La préparation des croquettes contenant le pesticide a été faite de la manière suivante. 25g de croquettes (Aquature 40% protéines, CENZONE) de poids moyen $0,00817 \pm 0,00198 \text{ g}$ ont été sélectionnées manuellement et à l'aide d'un tamis. Elles ont ensuite été immergées pendant 1 minute dans 30 ml d'une solution de méthylparathion à la concentration désirée dans un récipient en verre teinté. L'excès de la solution a été enlevé et mesuré. Par soustraction, la quantité de liquide ayant été absorbé par les croquettes a pu être calculée. Ainsi, la concentration nominale finale de méthylparathion en $\mu\text{g.g}^{-1}$ d'aliment a pu être calculée. Les croquettes ont ensuite été séchées pendant 30 minutes pour permettre l'évaporation du solvant. Par la suite, la nourriture a été conservée dans des fioles opaques, fermées, et au congélateur. Pour les calculs exacts des différentes concentrations, voir annexe 1 intitulée « préparation de l'aliment contenant le méthylparathion ». Des croquettes

contenant de l'acétonitrile sans méthylparathion ont également été préparées pour servir de contrôle négatif.

Dans les expériences utilisant le méthylparathion, les crevettes ont été nourries individuellement avec une croquette traitée par repas. Les repas ont eu lieu deux fois par jour (9h et 16h) dans les expériences préliminaires et seulement une fois par jour (9h) dans l'expérience finale. La durée du repas était systématiquement limitée à 30 minutes, durée après laquelle l'eau, les croquettes restantes et les fèces étaient siphonnées. Cette période de 30 minutes correspond au temps nécessaire à une crevette pour manger une croquette.

2.1.4. Préparation de *Vibrio parahaemolyticus* pour l'injection.

2.1.4.1. Origine et identification de la souche de *Vibrio parahaemolyticus* utilisée.

La souche de *Vibrio* utilisée a été isolée en 1998 à partir d'un cas de vibriose dans une ferme de crevettes de Sinaloa, Mexique. Cette souche a été identifiée par BIOLOG (Biolog, Hayward, USA), comme étant *Vibrio parahaemolyticus*. Elle a ensuite été ajoutée à la banque de micro-organismes du CIAD, Mazatlan sous la référence HL57. La souche mère est depuis conservée par congélation.

2.1.4.2. Préparation de la bactérie pour le marquage à la fluorescence.

Réactivation de la souche préservée.

La souche HL57 est conservée à -70°C. Elle a été réactivée en milieu TSB (Tryptic Soy Broth) complété avec 2% de NaCl au début de chaque expérience. La souche a ensuite étéensemencée dans 10ml de TSB, 2% NaCl à 30°C pendant 24h. La culture a été par la suite nettoyée par centrifugation (Biofuge Primor, DR/2010 Hach, USA), trois fois à 8000 g, à 10°C pendant 10 minutes. Les bactéries ont été remises en suspension dans une solution physiologique stérile de NaCl à 2.5%. Après cela, l'inoculum a été dilué ou concentré afin d'obtenir pour cette solution une densité optique (DO) de 1.1 à 610 nm dans un spectrophotomètre (HACH DR/2010). Cette densité optique correspond à une charge bactérienne de 1×10^8 CFU (Colony Forming Units)/ml.

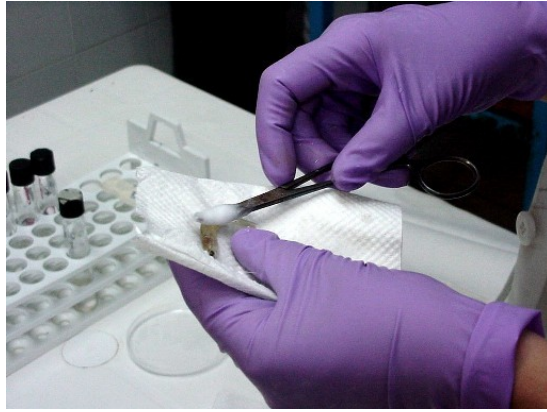
Marquage des bactéries à la fluorescence.

0,5 mg de DTAF (5-[4,6-Dichlorotriazin-2-YL] amino fluorescéine (SIGMA D-0531, Germany) a été ajouté dans 1ml de PBS stérile (Phosphate buffer (0,05M, 1,5%NaCl, pH:9)). Puis 50 μ l de cette solution ont été ajoutés à 1 ml de la suspension bactérienne (10^8 CFUml⁻¹). Le tout a ensuite été incubé à l'obscurité pendant 2h30 à 40°C. Dès lors, l'ensemble a été gardé à l'obscurité en couvrant les fioles avec du papier aluminium. Cette précaution a été prise pour limiter la dégradation du DTAF par la lumière. Le mélange (bactérie/fluorescéine) a été lavé trois fois dans du PBS par centrifugation (8000g, 10min, 10°C). Ensuite, les bactéries fluorescentes ont été remises en suspension dans 1 ml d'une solution stérile de Pirophosphate de sodium (0,02M, 1,5%NaCl). Ainsi, une concentration de 10^8 CFU/ml a pu être mesurée par spectrophotométrie. La concentration d'injection étant 10^5 CFU/ml, la préparation a subi une série de dilutions logarithmiques en utilisant une solution stérile de NaCl à 2,5%. C'est cette solution qui a été injectée aux animaux. Lors de la préparation de la solution à injecter, deux boîtes de pétri contenant du TCBS ont été inoculées avec 100 μ l de la solution à injecter diluée dix fois pour une des boîtes et cent fois pour l'autre. Elles ont été incubées pendant 24h à 30°C pour permettre le comptage des CFU (pour la préparation des réactifs voir annexe 2).

2.1.5. Techniques d'injection et de prélèvement.

2.1.5.1 Technique d'injection.

Les crevettes d'un aquarium ont été pêchées une par une à l'épuisette et rapidement séchées avec une serviette en papier puis désinfectées avec de l'alcool au site d'injection. En fonction de l'expérience, elles ont reçu 20 μ l ou 50 μ l de solution bactérienne (équivalent à 5.4×10^5 CFU ml⁻¹). Le site d'injection se situait systématiquement sur le côté gauche de l'animal, au niveau du troisième segment abdominal. L'injection était réalisée avec une seringue à insuline (0.5 ml Insulin syringe 29Gx13mm). Des crevettes recevant le même volume d'une solution saline stérile ont servi de contrôle négatif (Figure 2.2).



Désinfection locale au site d'injection.



Injection de HL57

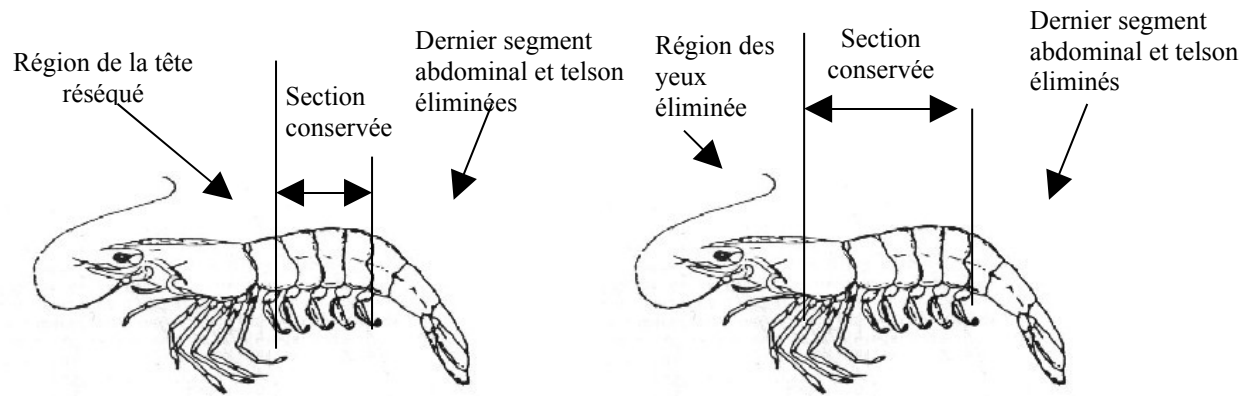
Figure 2.2 : Technique d'injection intramusculaire de *Vibrio parahaemolyticus* au niveau du troisième segment abdominal de *Litopenaeus vannamei*.

2.1.5.2. Technique de prélèvement pour l'histologie.

Les crevettes ont été fixées avec du Davidson's (Bell et Lightner, 1988) injecté par une seringue à insuline (0,5 ml Insulin syringe 29Gx13mm). Pour une bonne diffusion du fixateur, ce dernier a été injecté en plusieurs points : le site d'injection des bactéries, la région abdominale antérieure et postérieure de part et d'autre de l'animal. La région du céphalo-thorax contenant l'hépatopancréas a reçu une quantité plus importante de fixateur que la région abdominale. Au total, l'équivalent de 5 à 10% de la masse de l'animal a été injecté. Tout signe de vie a cessé immédiatement après injection du fixateur et les corps des crevettes ainsi fixées sont devenus blanchâtres. Les crevettes fixées ont été conservées pendant 24h dans une solution de fixateur de Davidson's correspondant à 10 fois leur volume. Puis, elles ont été transférées dans de l'alcool à 70°, jusqu'à leur analyse histologique.

Dans la première étude préliminaire, la tête, les derniers segments abdominaux, la queue, et les appendices des crevettes ont été éliminés (Figure 2.3.a).

Dans l'expérience finale, le 4^{ème} segment abdominal jusqu'au telson a été éliminé ainsi que la région des yeux. Contrairement à la première expérience préliminaire, l'hépatopancréas a été conservé (Figure 2.3.b). Puis les crevettes ont été coupées en deux selon un plan longitudinal pour que les coupes histologiques puissent être faites de l'intérieur vers l'extérieur.



2.3.a Pour l'étude préliminaire, la région de la tête et les derniers segments abdominaux ainsi que les appendices ont été enlevés.

2.3.b Dans l'expérience finale, le 4^{ème} segment abdominal jusqu'au telson ainsi que la région des yeux et les appendices ont été enlevés.

Figure 2.3 : Préparation des crevettes pour l'histologie.

La mise en paraffine des sections a été faite en utilisant le matériel suivant : TISSUE-TEK II, 4640B, Miles laboratories, cette appareillage réalise de manière automatique les processus de déshydratation et re-hydratation.

Les échantillons ont ensuite été mis en blocs de paraffine en utilisant le matériel suivant : JUNG, Leica Instruments, Germany. Dans l'étude préliminaire, des sections histologiques de 5 microns ont été faites et dans l'expérience finale, des sections de 2 microns ont été faites en utilisant un microtome (rotary microtome, Jung Histocut, Leica Instruments, Germany).

2.1.6. Techniques de coloration.

DAPI (4'6-diamidine-2-phénylindole)

Le DAPI (4'6-diamidine-2-phénylindole, SIGMA) est un fluorochrome spécifique de l'ADN qui se fixe spécifiquement à des polymères linéaires contenant des phosphates comme les polyphosphates et l'ADN. La concentration de DAPI utilisée dans l'étude a été de 3µg/ml.

La solution de DAPI a été préparée à partir d'une solution mère de 1µg/ml préalablement dissoute dans de l'eau distillée. De cette solution mère, 30µl ont été ajoutés à 9970µl d'eau distillée pour obtenir 10ml d'une solution à 3µg/ml.

La technique de coloration a été la suivante ;

- Xylène 5 min
- Xylène 5 min
- Alcool absolu 3 min 30 sec

- Alcool éthylique 95% 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 80% 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 50% 2 min
- Eau distillée 2 min
- DAPI (3µg/ml) 15 min d'incubation dans l'obscurité *
- Eau distillée 2 min
- Xylène 5 min

* Toutes les sections ont été recouvertes avec la solution de DAPI.

Haematoxyline, Eosine et Blanc

Les protocoles de coloration des sections par l'haematoxyline ou l'éosine étant des colorations histologiques utilisées de façon standard ils sont donnés dans l'annexe 3. La préparation des sections non colorées y figure également.

Haemtoxyline et Eosine.

La même remarque s'applique pour le protocole utilisé dans l'étude finale, toutes les sections ont été colorées avec de l'haematoxyline et de l'éosine (annexe 3).

Toutes les sections ont ensuite été montées en utilisant 40% de résine synthétique et 60% de xylène (HYCEL™, MEXIQUE). Puis, les sections ont été séchées pendant une nuit à 50°C.

2.1.7. Détermination de l'activité acétylcholinestérasique.

Cette expérience avait pour but de déterminer l'action du méthylparathion sur l'activité de l'acétylcholine estérase dans les crevettes exposées au pesticide. Tous les réactifs et solutions utilisés dans cet essai sont présentés dans l'annexe 4.

2.1.7.1. Préparation des animaux.

Pour les prélèvements, les animaux ont été déposés sur de la glace afin d'arrêter toute activité enzymatique. Ce sont les yeux et les pédoncules oculaires qui ont été prélevés. Pour cela, le rostre a été retiré à l'aide de petits ciseaux, les yeux et les pédoncules oculaires ont ensuite été disséqués en clampant la base des pédoncules avec une pince. Les échantillons ont par la suite

été placés dans un tube Eppendorf maintenu d'abord sur glace puis réfrigéré pendant 12 heures avant leur utilisation.

Les paires d'yeux ainsi prélevées ont été individuellement pesées puis placées dans un tube (1,7 ml) contenant du tampon phosphate. La quantité de tampon à utiliser a été calculée en fonction du poids des yeux. Un ratio poids/liquide de 1:20 a été utilisé. Chaque paire d'yeux a ensuite été écrasée avec des pinces et homogénéisée à l'aide d'un homogénéisateur (polytron PT 1300D, Kinematica AG, Switzerland) doté d'une fraise miniature de 5mm (Polytron aggregate, PT-DA 1305/2EC, Kinematica AG, Switzerland) à la vitesse de 12000 tours par minutes (tpm) pendant 50 secondes. Durant la phase d'homogénéisation, le prélèvement a été maintenu sur de la glace.

Les échantillons ont ensuite été centrifugés (BECKMAN, CS-15R centrifuge, USA) à 8500 tpm pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré en utilisant une pipette Pasteur et placé dans un tube Eppendorf. Les prélèvements ont ensuite été dilués par 2 afin de permettre une lecture optimale de l'activité enzymatique par densité optique (DO) dans un intervalle de 0,3000 à 0,9000. Tous les tubes Eppendorf ont finalement été congelés jusqu'à l'analyse de l'activité acétylcholinestérasique.

2.1.7.2. Mesure de l'activité enzymatique.

Des micro-plateaux de 96 puits (COSTAR, Corning, USA) ont été utilisées pour l'analyse de l'activité enzymatique. La première colonne a été laissée vide. La seconde a été remplie avec 50µl de tampon phosphate pour faire un blanc. 50µl de chaque prélèvement ont été distribués sur le plateau en faisant 4 mesures répétées par animal. Puis, 250µl du réactif (voir annexe 2.4) a été ajouté dans chaque puits. L'ensemble a été incubé pendant 10 minutes avant la lecture. Les prélèvements ont été analysés avec un spectrophotomètre (Labsystem Multiskan 354, Ascent, USA) à 414 nm. Une première lecture a été faite après les 10 minutes d'incubation, et une deuxième 5 minutes plus tard.

2.1.7.3. Détermination de la quantité de protéines dans le prélèvement.

L'activité de l'acétylcholinestérase est exprimée en mg de protéines. La quantité de protéines contenue dans l'échantillon est donc à déterminer. Pour cela, différentes dilutions d'une solution mère de globuline bovine à 0,4 mg/ml ont été préparées. Cinq concentrations ont été utilisées, 0 mg/ml, 0,008 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,032 mg/ml, et 0,04 mg/ml. Elles ont été

obtenues en ajoutant respectivement 0µl, 2µl, 5µl, 8µl, et 10µl dans les puits du plateau et en complétant avec de l'eau ultra-purifiée pour obtenir un volume final de 10µl par puits. Quatre mesures répétées par concentration ont été utilisées. Une courbe standard de la concentration en fonction de la densité optique a ensuite été tracée.

Les prélèvements du surnageant ont été dilués au 1:10 ou 1:11. Puis, 10µl de chaque échantillon dilué a été affecté à un puits sur le plateau. Quatre mesures répétées ont été une nouvelle fois réalisées par échantillon. Sur chaque puits, 250µl du réactif B (solution BIORAD: voir annexe 4) a été ajouté. L'ensemble a été laissé en incubation pendant 15 minutes puis lu en utilisant un filtre à 595 nm.

2.1.7.4. Analyse de l'activité acétylcholinestérasique.

L'activité acétylcholinestérase a été mesurée par colorimétrie en utilisant la méthode décrite par Ellman *et al.*, (1961) adaptée aux microplateaux (Herbert *et al.*, 1995).

Le principe en est le suivant :

Acetylthiocholine + *H2O* \xrightarrow{AChE} *thiocholine* + *acetate*
5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) $\xrightarrow{Thiocholine}$ *5-mercapto-2-nitrobenzoate*
 L'acétylcholine est hydrolysée par l'acétylcholinestérase pour former la thiocholine et de l'acétate. La thiocoline réagit alors avec le 5,5-dithio-bis (acide 2-nitrobenzoïque) libérant le 5-mercapto-2-nitrobenzoate que l'on dose : absorption à 414 nm, coefficient d'extinction molaire de $\epsilon = 1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

L'activité a été calculée en mg de protéines en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Activité} = \frac{\text{mDO}_{\text{AE}} \times \text{FD}_{\text{AE}} \times \text{F}}{0.0136 \times t \times \text{Cpr} \times \text{FD}_{\text{PA}}} \quad (\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$$

Avec

Cpr = la concentration de protéines dans l'échantillon (mg.ml⁻¹)

FD_{AE} = le facteur de dilution utilisé dans l'essai de mesure de l'acétylcholine.

FD_{PA} = le facteur de dilution utilisé dans l'essai de mesure des protéines.

F = Le volume total contenu dans un trou/volume de surnageant du prélèvement utilisé (300/50=6).

t = temps (5 minutes)

mDO = différence entre les deux lectures de DO dans l'expérience de détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase. (DO lecture2-DO lecture1) - différence de DO des blancs.

L'activité est exprimée en nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines.

2.2. Etudes préliminaires.

2.2.1. Détermination de la technique de coloration à utiliser et de la durée de la fluorescence de *Vibrio parahaemolyticus* marqué avec le DTAF dans les tissus.

Différentes techniques de colorations (DAPI, éosine, haematoxyline, et absence de coloration) ont été examinées. Des prélèvements réguliers ont été faits afin de déterminer la durée de la fluorescence dans les tissus. Dans un second temps, une des techniques de coloration (le DAPI) a été optimisée et la durée exacte de la persistance de la fluorescence a été déterminée. La distribution des animaux dans les deux expériences est illustrée dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1: Distribution des animaux dans l'étude préliminaire 1.

Traitement	expérience 1*	expérience 2*
Taille des réservoirs	30L	30L
Nombre de mesures répétées	1	2
Nombre d'animaux /aquarium	30	30

*expérience 1 : évaluation des différentes techniques de coloration et de la durée de la fluorescence dans les tissus.

*expérience 2 : amélioration de la technique DAPI et détermination de la disparition de la fluorescence.

2.2.1.1. Expérience 1: Evaluation des différentes techniques de coloration et durée de la fluorescence des *Vibrio parahaemolyticus* marquées avec le DTAF dans les tissus.

Les 30 crevettes utilisées dans cette expérience ont été acclimatées durant 4 jours précédant le début de l'expérience. Ces crevettes ont ensuite reçu une injection intramusculaire de 20µl (5.4×10^5 CFU ml⁻¹) d'une suspension de *V. parahaemolyticus* marqués de fluorescence. Plusieurs prélèvements ont eu lieu à 2,5h, 15,5h, 24h, 48h et 96h suivant l'injection (cinq crevettes ont été prélevées pour chaque temps).

Les différentes techniques de coloration utilisées

La sélection de la meilleure technique de coloration a été réalisée sur les cinq crevettes prélevées à 2,5h. Des sections longitudinales de 5 microns ont été faites sur trois d'entre elles et des coupes transversales sur les deux autres.

Un total de 25 lames a été préparé avec les colorants suivants : DAPI, ou haematoxyline ou éosine. Quelques lames ont été préparées sans coloration (blanc).

Durée de la fluorescence dans les tissus.

Les sections effectuées 15h, 24h, 48h, 72h, 96h après injection ont été préparées sans coloration pour déterminer si de la fluorescence était présente (sections longitudinales de 5 microns). Pour chaque animal prélevé, deux lames ont été préparées ce qui constitue un total de 10 lames par temps de prélèvement.

Les sections ont été analysées avec un microscope à fluorescence (OLYMPUS OPTICAL BH2-RFL-T3, Germany) équipé d'un filtre d'épi-fluorescence (BX 60, Germany). Pour observer la fluorescence, des agrandissements de x400 et x100 ont été utilisés, des photographies ont également été prises. Pour chaque section, au moins deux photographies ont été prises en utilisant l'épi-fluorescence et deux autres en utilisant un éclairage normal.

2.2.1.2. Expérience 2: Amélioration de la technique de coloration DAPI et détermination du temps de persistance de la fluorescence.

Deux aquariums de 30 l contenant chacun 30 juvéniles de *L. vannamei* ont été utilisés. Chaque aquarium a été individuellement aéré par deux petits tuyaux d'air. Au total, soixante crevettes ont été utilisées et ont reçu avec 50µl d'une suspension de *V. parahaemolyticus* HL57 marqués au DTAF. La densité de la suspension bactérienne a été mesurée à $2,98 \times 10^5$ CFU/ml. Cette fois-ci, l'injection intramusculaire a été faite en inclinant l'aiguille à 45° par rapport à la crevette pour améliorer la détection des bactéries sur les coupes histologiques.

Dans cette expérience, les temps de prélèvements ont été étalés sur les 48h suivant l'injection. Pour chacun des prélèvements à 2h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 30h, 36h, 42h, et 48h, cinq crevettes ont été utilisées.

Amélioration de la procédure de coloration du DAPI.

Afin d'améliorer la procédure de coloration du DAPI, le protocole a été modifié. Pour cela, des sections longitudinales de 5 microns ont été faites sur des crevettes prélevées 2h après injection. Autant de sections que nécessaire ont été faites pour sectionner la moitié de chaque crevette. Ces sections ont été mises sur lame. Près de vingt lames ont été réalisées par animal. Trois temps de contact du DAPI sur les lames ont été testés. La solution de DAPI a été laissée en contact avec les tissus montés pendant 5, 15, et 30 minutes. La phase de déshydratation du protocole a également été modifiée. Les modifications sont indiquées par des caractères en gras sur le protocole expérimental suivant.

- Xylène 5 min
- Xylène 5 min
- Alcool absolu 3 min 30 secondes
- Alcool éthylique 96% 3 min 30 secondes
- Alcool éthylique 80% 3 min 30 secondes
- Alcool éthylique 50% 2 min
- **DAPI (3µg/ml) 5 min, 15 min ou 30 min à l'obscurité**
- Eau distillée 2-3 immersions
- **Alcool éthylique 50% 5 immersions**
- **Alcool éthylique 80% 5 immersions**
- Alcool éthylique 96% 5 immersions
- Alcool absolu 5 min
- Xylène 5 min
- Xylène 5 min

Une déshydratation progressive était faite pour tenter d'améliorer la procédure de montage des lames.

Effet du DAPI à une concentration supérieure.

Afin d'optimiser la fluorescence donnée par le DAPI, 10 sections ont été faites pour déterminer l'effet d'une concentration plus élevée DAPI. Une concentration de

2*3µg/ml=6µg/ml a été essayée. Les lames ont été laissées en contact avec cette solution pendant 30 minutes.

Persistance de la fluorescence.

Afin de déterminer la persistance de la fluorescence des bactéries marquées par le DTAF, des sections de 5 microns ont été faites sur les crevettes prélevées (2h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 30h, 36h, 42h, et 48h après injection). A chaque temps de prélèvement, cinq animaux ont été utilisés et deux sections par animal ont été faites. Le but étant de visualiser la fluorescence des bactéries, les lames ont été montées sans coloration spécifique. Le même protocole que celui utilisé pour colorer les sections avec le DAPI a été utilisé mais cette fois-ci sans utiliser le DAPI (voir annexe 3). Un total de 100 lames a été réalisé. Des photographies en fluorescence et en lumière normale ont été prises en utilisant les objectifs x10, x40 et x100.

2.2.2. Détermination de la dose sub-létale de méthylparathion.

Ces études ont été effectuées afin d'établir la dose sub-létale de méthylparathion à utiliser dans l'étude finale.

En premier lieu, deux concentrations de méthylparathion (MPAR) ont été testées (6,48µg MPAR par g de croquettes et 19,06µg MPAR par g de croquettes). Les mortalités ont été enregistrées de façon journalière pendant 6 jours.

Suite à cette première expérience, trois autres concentrations (2,7µg/g, 4,04µg/g et 5,66µg/g) ont été testées pendant 4 jours. Les mortalités ont également été enregistrées une fois par jour. Le protocole expérimental est exposé dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2: Protocole expérimental de l'étude préliminaire 2: détermination de la dose sub-létale de méthylparathion. (MPAR)

	Expérience 1*				Expérience 2**				
Traitement : Concentration de MPAR utilisée par g d'aliment	6,48μ gMPA R	19,04μ gMPAR	Acétonitrile	Contrôle	2,7μg/g MPAR	4,04μg/g MPAR	5,66μg/g MPAR	Acétonitrile	Contrôle
Nombre de mesure s répétées	3	3	3	3	1	1	1	1	1
Distribution des crevettes	Chaque aquarium de 10l contenait 10 crevettes.								

*Le premier jour de l'expérience, quatre animaux moribonds nourris avec la concentration 19,04 μg MPAR/g d'aliment ont été prélevés 1h à 2h après le premier repas traité afin de déterminer l'activité acétylcholinestérasique.

**Quatre crevettes nourries avec 5,66 μg MPAR/g, quatre crevettes nourries avec des croquettes contenant de l'acétonitrile et quatre animaux nourris avec des croquettes normales ont été prélevés 1h après leur repas, au quatrième jour du traitement afin de mesurer l'activité acétylcholinestérasique.

2.3. Etude finale : Infection d'épreuve avec *Vibrio parahaemolyticus* en utilisant le méthylparathion comme facteur de stress.

Cette étude a été réalisée pour évaluer les effets d'une dose sub-létale de méthylparathion sur la crevette blanche lorsqu'elle est soumise à une infection d'épreuve avec *Vibrio parahaemolyticus*.

2.3.1. Protocole général.

Les crevettes ont été acclimatées pendant 1 journée puis ont subi un jeûne de deux jours avant le début de l'expérience. Les animaux ont été exposés au pesticide par voie orale pendant 4 jours. On leur a par la suite injecté les bactéries. Le protocole expérimental est exposé dans le tableau 2.3.

Matériels et Méthodes

Tableau 2.3: Protocole expérimental de l'**expérience finale** : Infection d'épreuve avec *Vibrio parahaemolyticus* utilisant le méthylparathion comme facteur de stress.

Traitement	Méthylparathion	Vibrio	Méthylparathion et vibrio	Acétonitrile	Contrôle
Nombre de mesures répétées	5	5	5	5	3
Nombre d'animaux	Chaque aquarium contenait 10 animaux				

Dans cette expérience, une concentration de 6,48 µg de MPAR par gramme d'aliment a été utilisée.

Les animaux ont été nourris à 8h30 du matin avec les croquettes contenant 6,48 µg MPAR.g⁻¹ et avec des croquettes sans pesticide à 4h00 de l'après-midi. Le temps d'exposition des animaux au pesticide a été de 4 jours. Au cinquième jour de l'expérience, on leur a injecté les bactéries. Suite à cela, elles ont reçu une alimentation sans pesticide.

Une suspension de HL57 contenant 3,39 x 10⁵ CFU/ ml a été préparée. Chaque animal des lots nommés «Vibrio» et «Méthylparathion + Vibrio» a reçu 20µl de la suspension bactérienne. Pour les 2 autres lots (méthylparathion (MPAR) et acétonitrile (A)), les crevettes ont reçu avec 20µl d'une solution saline stérile. Les crevettes du traitement nommé «contrôle» n'ont ni été exposées au pesticide ni reçu d'injection. Dans l'étude finale, les bactéries utilisées n'ont pas été marquées avec le DTAF.

Les mortalités ont été enregistrées journalièrement, du début de l'expérience (jour 1) à la fin (jour 8). Etant donné le faible nombre d'animaux survivants à l'issue des 8 jours de l'expérience, tous les animaux restants ont été prélevés pour l'histologie :

1. Méthylparathion et injection de *vibrio*, 25 animaux
2. Méthylparathion et injection de solution saline stérile, 43 animaux
3. Acétonitrile et injection de *vibrio*, 39 animaux
4. Acétonitrile et injection de solution saline stérile, 45 animaux

2.3.2. Détermination de l'activité acétylcholinestérasique

Les prélèvements pour la détermination de l'activité acétylcholinestérasique ont eu lieu au jour de l'injection (jour 5) ainsi qu'au jour du prélèvement pour l'histologie (jour 8).

Au jour 5, quinze animaux ont été prélevés pour l'analyse de l'activité acétylcholinestérasique. Parmi eux, cinq ont été traités avec 6,48µg MPA/g d'aliment par jour, cinq autres ont été traités avec l'acétonitrile et les cinq derniers ont reçu une alimentation sans pesticide ni solvant durant l'expérience.

Au jour 8, une partie des animaux destinés à l'analyse histologique ont été prélevés pour la détermination de l'activité acétylcholinestérasique avant la fixation (la détermination de l'AChE ne fait intervenir que les yeux de l'animal qui ne sont pas nécessaires pour l'histologie). Le nombre d'animaux utilisés dans chaque traitement est présenté ci-dessous.

1. Méthylparathion et injection de *Vibrio*, 20 animaux.
2. Méthylparathion et injection d'une solution saline stérile, 20 animaux.
3. Acétonitrile et injection de *Vibrio*, 20 animaux.
4. Acétonitrile et injection d'une solution saline stérile, 20 animaux.
5. Contrôle, 20 animaux

2.3.3. Analyse des coupes histologiques.

Toutes les crevettes prélevées ont été préparées comme exposé dans le paragraphe 2.1.5.2. Deux sections ont été faites par animal avec une épaisseur de 20 µm séparant les deux sections. Chaque section a été analysée sous microscope optique (Axiolab microscope, drb KT, Zeis, Germany) relié à une caméra numérique (Exwave HAD Video camera digital, Sony color, SSC-DC 54A). Des photographies numériques ont été prises en suivant la procédure décrite dans l'annexe 5 intitulée « Procédure suivie pour la capture d'images numériques ».

2.4 Analyse statistique.

2.4.1. Analyse des mortalités et de l'activité acétylcholinestérasique.

L'homogénéité de la variance des échantillons a été testée pour chaque groupe. La normalité des échantillons a été testée en utilisant le test de Kolmogorov-Smirnov. Dans les expériences

où seulement deux groupes ont dû être comparés et peu d'animaux ont été prélevés, un test de Mann Whitney U a été appliqué. Quand plusieurs groupes ont dû être comparés et que la normalité ainsi que l'homogénéité de variance étaient vérifiés, une ANOVA à un facteur a été appliquée. Si les échantillons n'étaient pas distribués normalement ou que l'homogénéité de la variance n'était pas vérifiée, un test non paramétrique a été appliqué.

Afin de comparer les mortalités des différents lots, les mortalités cumulées ont été analysées avec un test chi deux.

2.4.2. Analyse histologique.

La taille des échantillons a été calculée à l'aide du logiciel d'épidémiologie Win-Episcopes. La prévalence de vibriose a été estimée à 35% (Abad-Rosales, non publié 2000). Dans ces conditions, avec un intervalle de confiance de 95%, le nombre d'animaux à prélever afin de pouvoir détecter la vibriose a été de 32 animaux pour chaque traitement.

Pour analyser les coupes histologiques faites dans l'étude finale, la présence ou l'absence d'une lésion a été enregistrée. L'ensemble des résultats a ensuite été analysé à l'aide d'un logiciel d'épidémiologie, Epi-Info (version 2000, pour Microsoft NT). Ce logiciel est notamment utilisé dans le calcul de risques relatifs, d'incidences et de prévalences ainsi que la gestion de réseaux d'épidémio-surveillance. Il nous a permis de déterminer des risques relatifs, aussi appelés force d'association. La force d'association ou risque relatif entre un facteur et une maladie est calculé comme un ratio entre la proportion de malades dans le groupe exposé et la proportion des malades dans le groupe non exposé. S'il n'y a pas d'association entre le facteur et la maladie, le risque relatif sera de 1, en excluant la variation due aux erreurs d'échantillonnage. Plus la valeur du risque relatif s'éloigne de 1, plus l'association est forte entre la maladie et le facteur. Puisque le risque relatif est un ratio entre deux proportions, il n'a pas d'unité. En termes de cause de maladie, si le risque relatif est inférieur à 1, le facteur peut être considéré comme facteur protecteur. Si le risque relatif est supérieur à 1, le facteur peut être considéré comme un facteur putatif (Wayne, 1987). Le risque relatif est calculé de la façon suivante :

Facteur: Traitement, p.ex. . *Vibrio*

Lésion, ex : nécrose musculaire		Oui	Non	Total
	Oui	a	b	a+b
	Non	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	total

La lecture du tableau se fait de la façon suivante, “a” est le nombre d’animaux exposés au traitement et qui ont développé la lésion, “b” est le nombre d’animaux non exposés et qui ont pourtant développé des lésions. De la même façon, “c” est le nombre d’animaux qui ont été exposés mais qui n’ont pas développé de lésions et ainsi de suite.

Le risque relatif sera alors :

$$RR = (a/a+c) \div (b/b+d)$$

En plus, les lésions ont reçu un grade en fonction de leur intensité et les fréquences correspondant à ces intensités ont été calculées.

3. Résultats.

3.1. Paramètres d'eau.

Avant le début des expériences, la salinité était de 35‰ et la température des aquariums de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Durant les expériences préliminaires la température des aquariums a fluctué autour de $25,4^{\circ}\text{C} \pm 0,3$ et la salinité de l'eau autour de $35,05\text{‰} \pm 0,08$. Durant l'expérience finale, la température moyenne était de $25,4^{\circ}\text{C} \pm 0,3$, la salinité était de $35,05\text{‰} \pm 0,08$, et le pH de $7,2 \pm 0,05$.

3.2. Evaluation de différentes techniques de coloration et évaluation de la durée de persistance dans les tissus de la fluorescence des *Vibrio parahaemolyticus* marqués avec le DTAF

Dans cette expérience préliminaire, différentes techniques de coloration (DAPI, éosine, haematoxyline, et absence de coloration) ont été évaluées. Elles ont permis de déterminer le temps de persistance de la fluorescence des bactéries marquées dans les tissus. Les lames non colorées ont été utilisées en guise de contrôle pour vérifier que la procédure générale de coloration (hydratation et déshydratation) n'interférait pas avec la fluorescence.

3.2.1. Différentes techniques de coloration

Le DAPI

La lecture des lames a été gênée par la présence d'une grande quantité de bulles d'air dues à une mauvaise procédure de montage. Malgré tout, la fluorescence a pu être observée aussi bien sur les tissus que sur les bactéries (figure 3.1 et 3.2). Des photographies ont été prises en lumière fluorescente et normale (objectif x40). On a pu remarquer que la fluorescence s'estompait rapidement après la prise de la photographie.

Haematoxyline

Les sections colorées à l'haematoxyline sont apparues trop foncées et la fluorescence a disparu presque immédiatement après le début de l'observation microscopique. Aucune photographie n'a été prise avec cette coloration qui n'a plus été utilisée par la suite.

Résultats

Eosine.

Sur les sections colorées avec l'éosine, une fluorescence marquée a pu être observée. Celle-ci a été observée à la fois sur les tissus et sur les bactéries (Figures 3.3 et 3.4). Des photographies ont été prises sous lumière fluorescente et normale en utilisant les objectifs x40 et x10.

Sections non colorées

Les sections non colorées, appelées blanches, ont été examinées pour la présence ou l'absence de fluorescence des bactéries. Les tissus n'étaient que difficilement visibles.

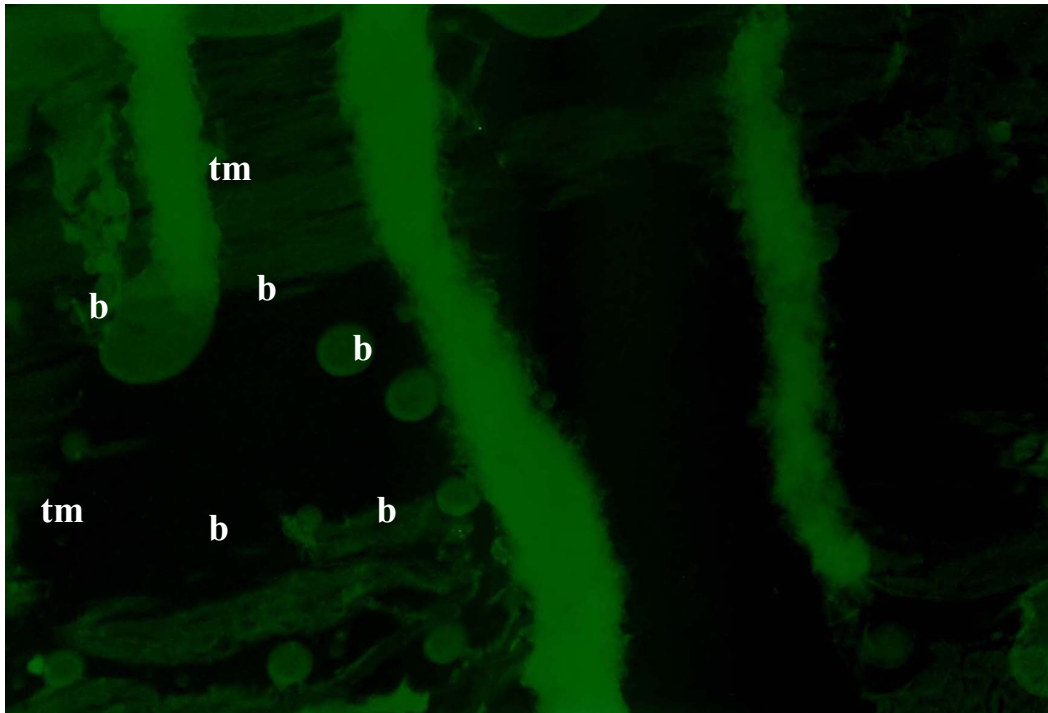


Figure 3.1 : Section longitudinale du muscle abdominal. Section colorée avec le DAPI (4'6-diamidine-2-phénylindole), visualisée en épi fluorescence. Noter les bulles d'air (b), et le tissu musculaire (tm). (x400).

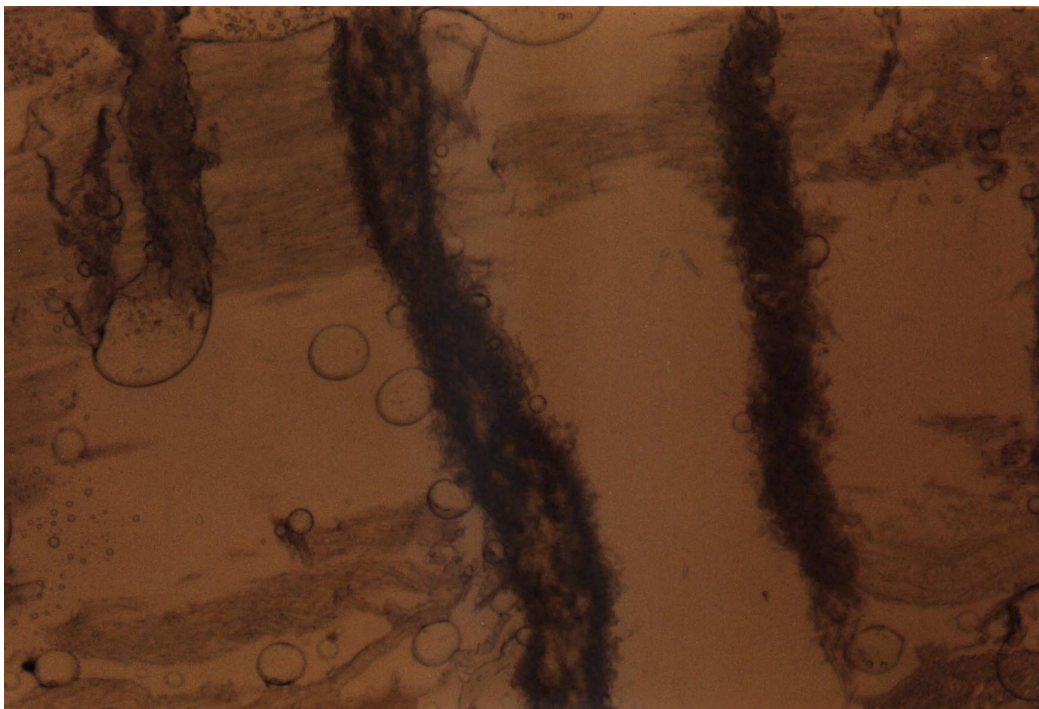


Figure 3.2: Section longitudinale du muscle abdominal. Même section colorée avec le DAPI (4'6-diamidine-2-phénylindole), visualisée avec de la lumière normale. (x400).

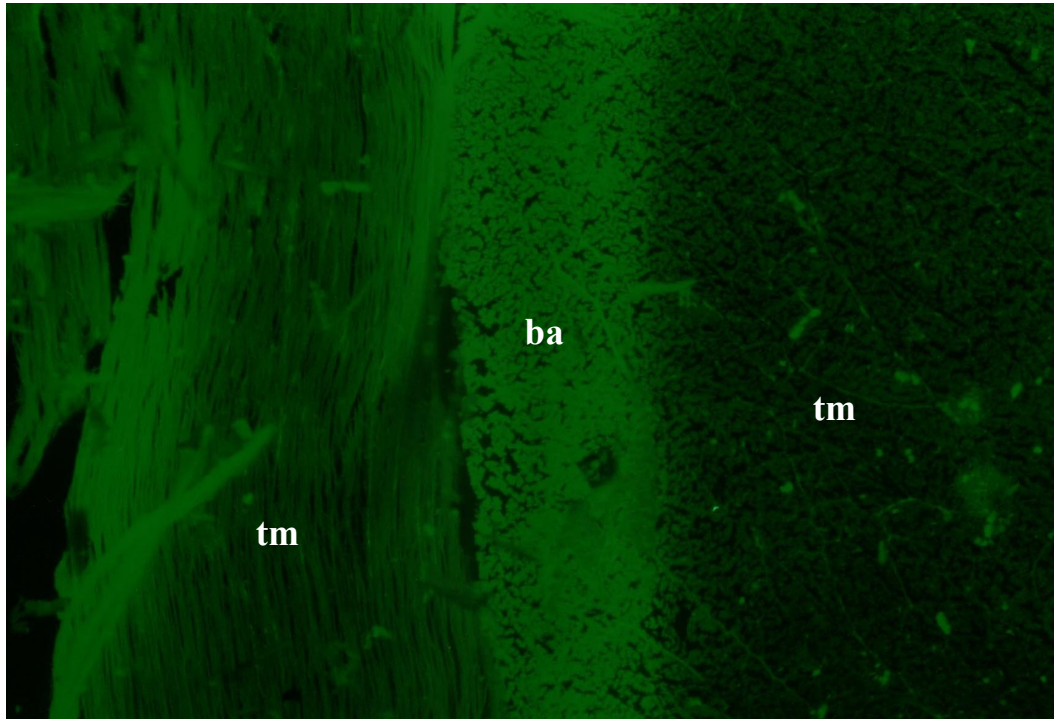


Figure 3.3: Section longitudinale du muscle abdominal, colorée avec l'éosine et visualisée en épi fluorescence. Noter que de la fluorescence peut être observée dans le tissu musculaire (tm). La fluorescence marquée (ba) est potentiellement indicative de présence de bactéries. (x100).

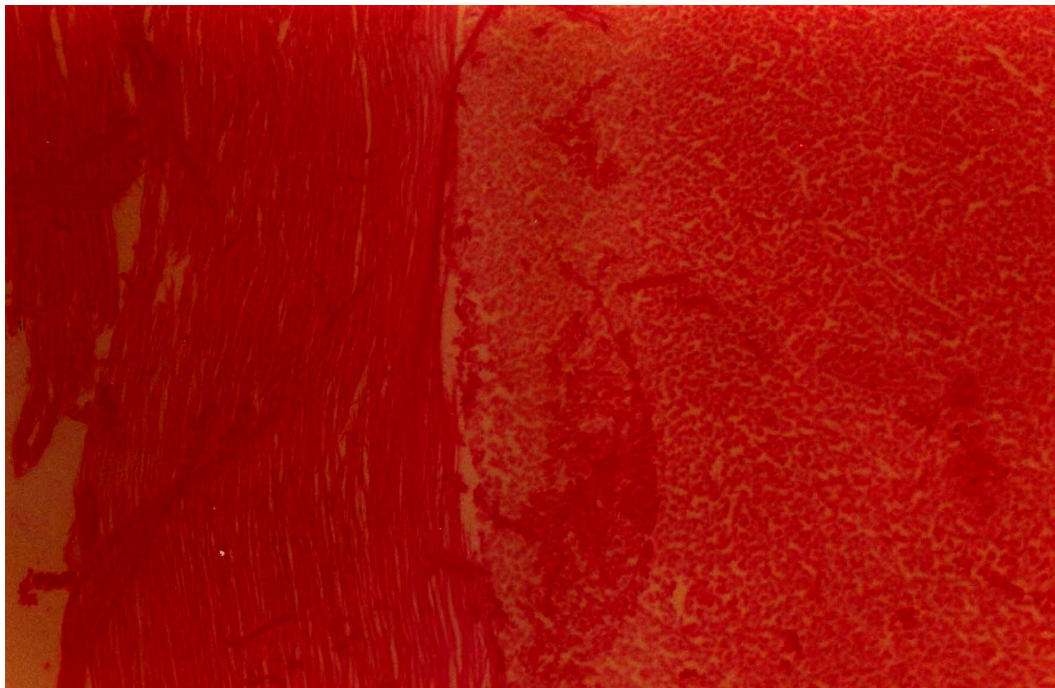


Figure 3.4: Même section longitudinale dans le muscle abdominal, colorée avec de l'éosine, visualisée avec de la lumière normale. (x100).

3.2.2. Détermination de la persistance de la fluorescence bactérienne.

Les derniers échantillons sur lesquels de la fluorescence a pu être observée sont les prélèvements réalisés 15 heures après l'injection. Aucun signe de fluorescence n'a par contre été observé sur les sections réalisées 48h après l'injection des bactéries marquées.

Dans une deuxième étude où les prélèvements étaient concentrés entre 15h et 48h après injection, les sections des crevettes prélevées à 30h n'ont montré aucun signe de fluorescence. Par contre, les sections faites avec les prélèvements réalisés 24h après injection en ont montré. Il est donc probable que la fluorescence des bactéries marquées avec le DTAF persiste entre 24h et 30h après leur injection. Or, les prélèvements de l'expérience finale ont été réalisés 5 jours et 8 jours après l'injection des bactéries. Après un tel délai, toute trace de fluorescence aurait disparu. C'est pourquoi le DTAF, visant à mettre en évidence les bactéries fluorescentes, n'a pas été utilisé dans l'expérience finale.

3.2.3. Amélioration de la technique de coloration DAPI.

Dans les sections colorées avec le DAPI, la procédure de montage a été améliorée par un changement du protocole. Cette fois, aucune bulle d'air n'a gêné la lecture mais l'analyse des sections a été difficile à cause de nombreux artefacts. Par exemple, durant les dernières immersions de Xylène, des morceaux de tissus ont semblé se détacher des lames. C'est pourquoi certaines parties des tissus ont été pliées et difficiles à interpréter.

Selon les sections, le DAPI avait été laissé au contact des tissus pendant 5, 15 ou 30 minutes. Aucune différence liée au temps de contact n'a été observée. Afin de confirmer la présence ou l'absence des bactéries sur les sections, des objectifs x40 et x100 à immersion ont été utilisés. Les photographies prises à ces grossissements n'ont pas clairement prouvé la présence de bactéries (figures 3.5, 3.6, 3.7). L'observation en lumière normale des sections n'ayant pas reçu de coloration (blancs) n'a pas permis la visualisation des tissus ou celle des bactéries. En lumière fluorescente, les sections colorées avec le DAPI et celles non colorées ont la même apparence.

L'utilisation d'une dose plus importante de DAPI (double concentration de $6\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) resté en contact pendant 30 minutes avec les lames n'a pas amélioré la coloration des tissus. Comme la technique utilisant le DAPI n'a pas donné les résultats escomptés, et que de nombreux artefacts ont été observés, elle a été abandonnée. Les sections de l'expérience finale ont été colorées avec un protocole de coloration histologique classique, c'est-à-dire haematoxyline/éosine.



Figure 3.5: Section longitudinale de muscle, colorée avec le DAPI (4'6-diamidine-2-phénylindole) et visualisée en épi fluorescence, utilisant un temps d'incubation de 30 min. Noter que la fluorescence (ba) est potentiellement indicative de la présence de bactéries (x100).

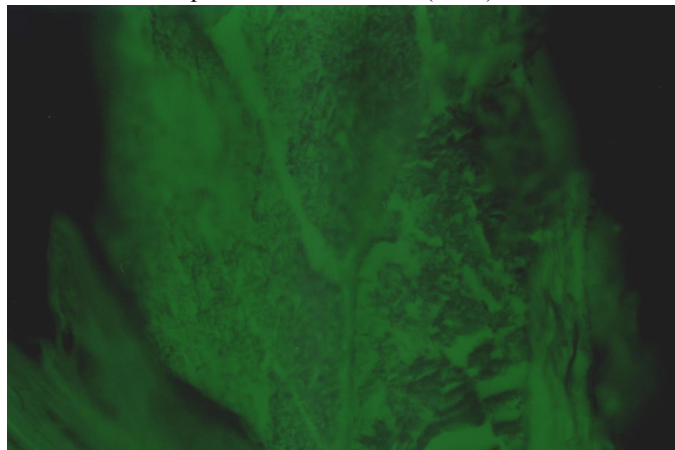


Figure 3.6: Même section de muscle, colorée avec le DAPI à un grossissement supérieur (x 400).

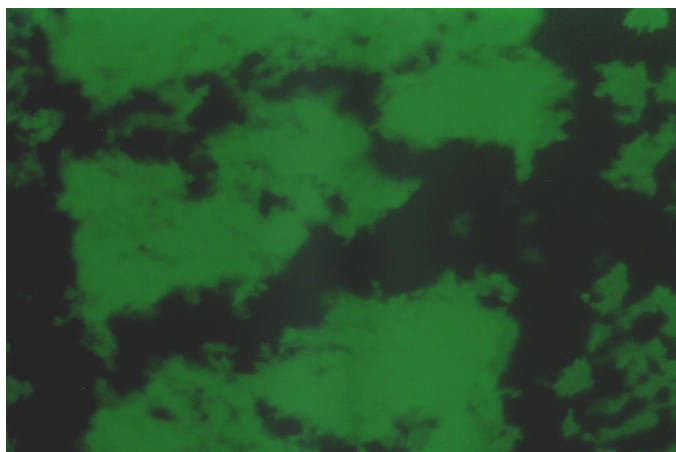


Figure 3.7: Même section du muscle, colorée avec le DAPI à grossissement supérieur. Noter qu'aucune présence de bactérie ne peut être clairement mise en évidence (x 1000).

3.3. Détermination de la dose sub-létale de méthylparathion.

3.3.1. Etude de la toxicité aiguë.

Ces études ont été conduites en administrant 6,48 et 19,04 µg de méthylparathion par g d'aliment.

Observations générales.

Pendant la période d'acclimatation, aucune mortalité n'a été observée. Au premier jour de l'expérience, quelques crevettes nourries avec 19,04µg de méthylparathion par g d'aliment ont exhibé un comportement anormal 40 minutes après le repas. Les symptômes observés étaient une excitabilité accrue, une natation erratique, des cognements contre les parois et de la natation en cercle. Une réponse de fuite anormalement importante était observée chaque fois que l'animal rencontrait un obstacle. Puis, après un quart d'heure, ces crevettes sont devenues léthargiques, s'immobilisant sur le fond des aquariums, couchées sur le côté ou sur le dos, remuant leurs pléopodes avant de mourir.

Deux à trois jours après le début de l'alimentation avec le méthylparathion, quelques crevettes des traitements à 6,48µg/g et 19,04 µg/g de méthylparathion ont présenté une coloration blanchâtre avec un aspect opaque de la musculature de leurs segments abdominaux. Les crevettes survivantes alimentées avec le méthylparathion sont devenues de plus en plus difficiles à cause de leur incapacité à s'alimenter. Les crevettes nourries avec l'acétonitrile ou celles nourries sans pesticide n'ont pas montré ces signes.

Mortalités.

Avec la concentration la plus élevée (méthylparathion: 19,04 µg par g d'aliment), les mortalités ont été les plus importantes pendant le premier jour d'alimentation (0.467 ± 0.115) (tableau 3.1). Les mortalités ont été enregistrées pour évaluer la toxicité du pesticide contenu dans les croquettes. Les résultats sont exposés dans le tableau 3.1 et la figure 3.8.

Résultats

Tableau 3.1: Mortalités journalières pendant l'exposition orale à 6,48µg/g et 19,04µg/g de méthylparathion. (n=30)

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6
6,48µg.g⁻¹ □±SD Nombre de morts	0.033±0.057 (1)	0.133±0.057 (4)	0±0 (0)	0±0 (0)	0±0 (0)	0.066±0.057 (2)
19,04µg.g⁻¹ □±SD Nombre de morts	0.467±0.115 (14)	0.1±0.1 (2)	0.133±0.057 (4)	-	-	-
Acétonitrile	0	0	0	0	0	0
Contrôle	0	0	0	0	0	0

Après cette période, moins de mortalités ont été enregistrées ($0,1 \pm 0,1$ et $0,133 \pm 0,057$). A la concentration de 6,48µg de méthylparathion par g d'aliment, le maximum de mortalité a été observé le second jour (0.133 ± 0.057). Le nombre cumulé de crevettes mortes est inférieur (Figure 3.8).

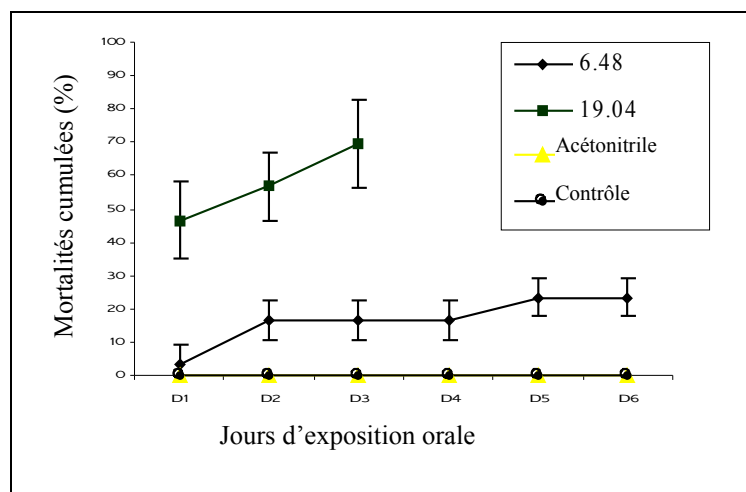


Figure 3.8: Mortalités cumulées de *Litopenaeus vannamei* pendant l'exposition orale à 6,48µg et 19,04µg de MPAR/g d'aliment.

Les mortalités cumulées des crevettes nourries avec 19,04µg MPAR/g se sont élevées à $69,66\% \pm 13,33$ au jour 3 tandis que chez les crevettes exposées à 6,48µg of MPAR/g, la mortalité n'est montée qu'à $16,6\% \pm 5,7$. Ces données ont été analysées en utilisant un test chi deux. Une différence significative a été trouvée entre ces traitements ($\chi^2 = 58,33$, DL = 3, $p < 0,001$).

Comme les mortalités du traitement 19,04 μg MPAR/g d'aliment ont été trop élevées pour être considérées comme une dose sub-létale, l'alimentation des crevettes dans ce groupe a été arrêtée après trois jours. L'alimentation avec la concentration de 6,48 μg de méthylparathion/g d'aliment a été continuée pendant 6 jours. Chez les crevettes des autres lots, « acétonitrile » et « nourriture sans pesticide ni solvant », aucune mortalité n'a été observée.

Détermination de l'activité acétylcholinestérasique

Afin de déterminer si le méthylparathion contenu dans les aliments a pu induire une inhibition de l'activité acétylcholinestérasique, quatre animaux moribonds ayant été nourris avec l'aliment contenant 19,04 μg MPAR/g ont été prélevés le premier jour de l'expérience, après leur premier repas,. Même si elles ont été prélevées vivantes, ces crevettes ont été comptabilisées dans le relevé des mortalités. En effet, toutes les autres crevettes qui ont exhibé les mêmes signes d'agonie sont mortes par la suite, très vite paralysées et victimes du comportement cannibale des autres crevettes. La figure 3.9 illustre l'analyse de l'activité acétylcholinestérasique (Activité AChE).

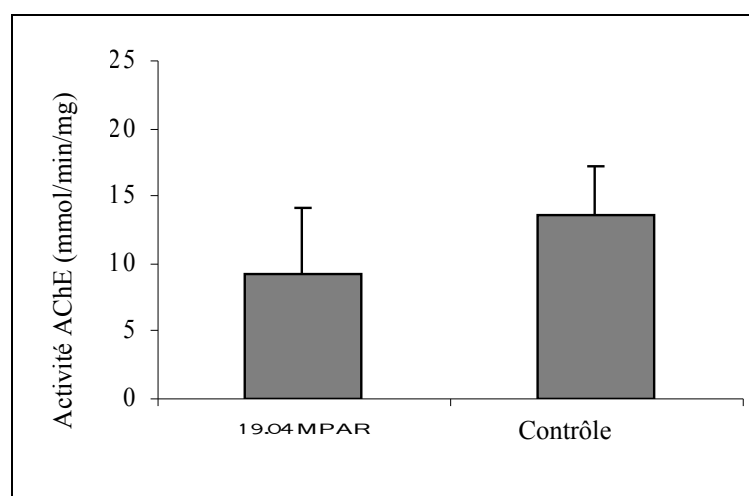


Figure 3.9: Activité enzymatique de l'acétylcholine estérase des *Litopenaeus vannamei* nourries avec les croquettes contenant 19,04 μg MPAR/g d'aliment le premier jour de l'exposition au pesticide. ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéines).

L'activité AChE des animaux nourris avec le méthylparathion a été de 9,24 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines \pm 4,86. Les groupes contrôles, n'ayant reçu ni pesticide ni solvant, ont eu une activité de 13,65 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéines \pm 3,49. La moyenne, l'écart type ainsi que les valeurs minimales et maximales calculées sont exposés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2. Moyenne, écart type, valeurs minimales et maximales de l'activité acétylcholinestérasique chez les crevettes nourries avec 19,04µg MPA/g d'aliment le premier jour d'exposition. (nmol.min⁻¹.mg⁻¹ protéines).

	moyenne	écart type	min	max
Contrôle	13,65	3,49	10,71	17,23
19,04µg/g	9,24	4,86	3,20	15,88

Etant donnée la petite taille de ces deux échantillons, un test de Man Whitney U a été utilisé afin de comparer les moyennes des deux prélèvements. La moyenne de l'activité AChE des quatre crevettes nourries avec 19,04 µg MPA/g ne s'est pas avérée significativement différente de celle des quatre animaux du groupe de contrôle (U=3, p>0,05, n=4).

3.3.2. Etude de la toxicité subaiguë.

Les concentrations suivantes de méthylparathion par g d'aliment ont été utilisées : 2,7µg, 4,04 µg et 5,66µg.

Observations générales.

Pendant la période d'acclimatation, aucune mortalité n'a été observée. Après l'alimentation avec la nourriture contenant les trois différentes concentrations de pesticide, aucune mortalité, aucun comportement anormal ou signe d'opacité musculaire n'a été constaté.

Mesure de l'activité acétylcholinestérasique.

Quatre animaux nourris avec 5,66 µg MPA/g, quatre animaux nourris avec des croquettes contenant de l'acétonitrile et quatre animaux nourris avec de l'aliment sans pesticide ni solvant ont été prélevés après quatre jours de traitement, 1h après le premier repas de la journée. Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3. Moyenne, écart type, valeurs minimales et maximales de l'activité acétylcholinestérasique chez les crevettes nourries avec 5,66µg MPAR/g d'aliment après 4 jours d'exposition. (nmol.min⁻¹.mg⁻¹ protéines).

	moyenne	Ecart type	min	max
Contrôle	13.65	2.33	10.71	17.23
Acétonitrile	19.59	7.50	11.48	31.77
5,66 µg/g	13.46	2.33	9.61	15.68

Le groupe acétonitrile présentait une activité de 143% et le groupe traité avec 5,66 µg/g de pesticide présentait une activité de 98,6% par rapport au groupe contrôle. L'analyse de ces données n'a pas montré de différence significative de l'activité AChE entre les différents groupes (ANOVA, F=1,621, p=0,251, n=4).

Puisque aucune mortalité n'a été observée et aucune inhibition de l'activité AChE n'a été détectée, la dose utilisée dans l'expérience finale pour se rapprocher au maximum de la dose subaiguë a été fixée à 6,48µg de méthylparathion/g d'aliment. Par contre les crevettes n'ont été nourries qu'une fois par jour avec cette dose au lieu de deux fois par jour dans les expériences précédentes.

3.4. Test à l'épreuve avec *Vibrio parahaemolyticus* utilisant le méthylparathion comme un facteur de stress.

Cette étude a été conduite afin d'examiner les effets d'une dose sub-létale de méthylparathion sur la crevette blanche avant un test à l'épreuve avec *Vibrio parahaemolyticus*.

3.4.1. Observations générales.

Le premier jour de distribution de l'aliment contenant du MPAR, une altération légère du comportement a été observée chez quelques animaux (notamment de la natation erratique et en cercle). Par la suite, ce comportement anormal s'est fait plus rare. Les crevettes ayant reçu l'acétonitrile et celles ayant reçu une alimentation normale n'ont pas développé de comportement anormal. Dans la nuit suivant l'injection de *Vibrio*, un nombre important d'animaux traités sont morts. Ces animaux semblent avoir mué avant de mourir

3.4.2. Mortalités.

Les mortalités ont été enregistrées du jour 0 au jour 8 (tableau 3.4.).

Tableau 3.4 : Mortalités journalières pendant l'exposition orale à 6,48 MPAR µg/g d'aliment et après l'injection de *Vibrio parahaemolyticus* au jour 5.

Jours	Période d'alimentation avec le MPAR				Injection	Période post-injection		
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7	Jour 8
MPAR et solution saline □±SD Nombre de morts	0,02±0,044 (1)	0,02±0,044 (1)	0,02±0,044 (1)	0,02±0,044 (1)	0	0	0	0
Acétonitrile et <i>Vibrio</i> □±SD Nombre de morts	0	0	0	0	0,1±0,071 (5)	0,02±0,044 (1)	0	0
MPAR/<i>Vibrio</i> Combinés □±SD Nombre de morts	0,02±0,044 (1)	0	0,02±0,044 (1)	0	0,32±0,240 (16)	0,04±0,054 (2)	0	0
Acétonitrile et solution saline	0	0	0	0	0	0	0	0
Contrôle	0	0	0	0	0	0	0	0

Pendant la période d'alimentation avec le méthylparathion les quatre premiers jours, des mortalités ont été enregistrées chez les crevettes nourries avec le pesticide. Les mortalités ont eu lieu 1 à 2h après la prise de nourriture. Il n'y a jamais eu plus d'une crevette morte par jour par aquarium durant cette période. Aucune mortalité n'a été observée chez les crevettes nourries avec l'acétonitrile ou avec de l'aliment normal et les mortalités cumulées sont présentées dans la figure 3.11. L'analyse statistique de ces résultats n'a pas montré de différence significative entre les lots ($\chi^2=7,560$, DL=3, $p=0,056$).

L'alimentation avec le méthylparathion a été arrêtée après l'injection de bactéries. A partir de ce jour aucune mortalité n'a été observée chez les crevettes ayant reçu une injection d'une solution saline (20µl).

Résultats

Pour les crevettes ayant reçu du *Vibrio*, les mortalités ont commencé 8 heures après l'injection. Les mortalités ont été les plus élevées le jour de l'injection et ont duré pendant 2 jours. Le jour de l'injection, les crevettes nourries avec l'acétonitrile et injectées avec le *Vibrio*, ont eu une mortalité de $0,1 \pm 0,071$ animaux par aquarium tandis que les crevettes nourries avec le méthylparathion et injecté avec les bactéries ont eu une mortalité trois fois plus importante ($0,32 \pm 0,240$). Le second jour après l'injection, les crevettes nourries avec l'acétonitrile et injectées avec *Vibrio* ont eu une mortalité de $0,02 \pm 0,044$ animaux par aquarium, tandis que les crevettes nourries avec le méthylparathion et injectées avec les bactéries ont eu une mortalité deux fois plus importante ($0,04 \pm 0,054$).

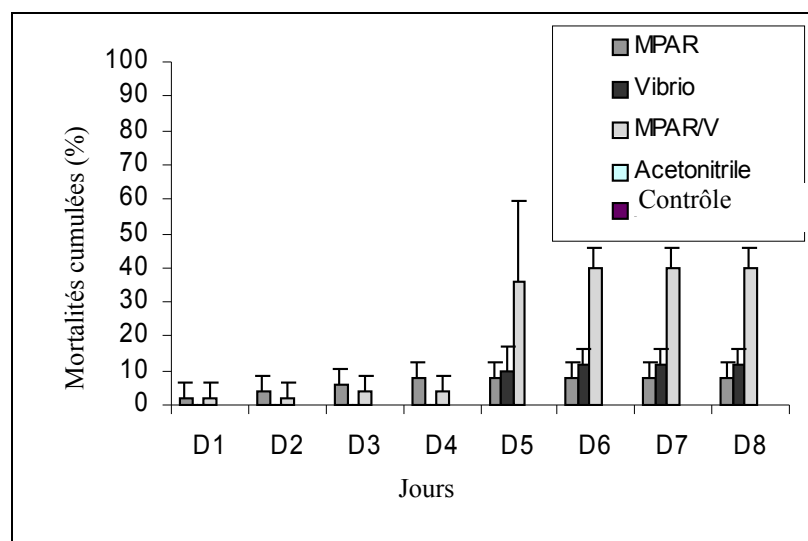


Figure 3.10: Mortalités cumulées de *Litopenaeus vannamei* après exposition orale à $6,48 \mu\text{g}$ MPAR/g d'aliment et injection de *Vibrio parahaemolyticus*.

Les mortalités cumulées au jour 8 ont été de $8\% \pm 4,47$ pour MPAR, $40\% \pm 5,55$ pour MPAR/V, $12\% \pm 4,47$ pour *Vibrio* et 0 pour le contrôle et l'acétonitrile. L'analyse statistique de ces résultats révèle une différence significative entre les traitements ($\chi^2 = 35,608$, DL = 3, $p < 0,001$).

3.4.3. Mesure de l'activité acétylcholinestérasique.

*Au jour 5, jour d'injection de *Vibrio parahaemolyticus*.*

Cinq animaux de chaque régime alimentaire ont été prélevés de manière aléatoire (cinq animaux ayant reçu 6,48µg MPAR/g par jour pendant 4 jours, cinq animaux ayant reçu de l'aliment contenant de l'acétonitrile et cinq animaux ayant reçu de l'aliment normal). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5. Moyenne, écart type, valeurs minimales et maximales de l'activité acétylcholinestérasique chez les crevettes nourries avec 6,48µg MPAR/g d'aliment pendant 4 jours et prélevées le jour 5. (nmol.min⁻¹.mg⁻¹ protéines).

	moyenne	écart type	min	max
Contrôle	14,35	2,90	11,06	19,27
Acétonitrile	17,90	2,26	16,74	20,66
6,48 µg/g	15,26	2,85	12,89	20,20

Le groupe acétonitrile présentait une activité de 122% et le groupe traité avec 6,48 µg/g de pesticide présentait une activité de 106% par rapport au groupe contrôle. L'analyse de ces données n'a pas montré de différence significative de l'activité AChE entre les différents groupes (ANOVA, F=2,386, p=0,134, n=5).

Au jour 8, jour du prélèvement pour l'histologie.

Un minimum de 20 animaux a été prélevé par traitement. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6. Moyenne, écart type, valeurs minimales et maximales de l'activité acétylcholinestérasique chez les crevettes après 4 jours d'exposition à 6,48µg MPAR/g d'aliment et prélevées le jour 8. (nmol.min⁻¹.mg⁻¹ protéines).

	moyenne	Ecart-type	min	max
Contrôle	19,07	4,90	11,73	29,54
MPAR/V	21,18	9,77	11,58	58,54
<i>Vibrio</i>	19,98	3,76	16,57	30,85
Acétonitrile	17,32	8,23	5,78	44,23

Les groupes MPAR, MPAR/V, *Vibrio* et Acétonitrile présentaient des activités AChE de respectivement 84%, 111%, 104% et 91% par rapport au groupe contrôle. L'analyse statistique de ces résultats n'a pas montré de différence significative entre les différents traitements (F=2,386, p=0,134, n=20).

3.4.4. Analyse des sections histologiques.

Le jour 8, toutes les crevettes ont été prélevées pour analyse histologique (coloration haematoxyline/éosine).

Observations générales.

Aucune anomalie n'a été observée dans la glande antennale, le système nerveux, le cœur, le tissu haematopoiétique, les intestins, et l'estomac. Par contre, dans d'autres organes comme l'hépatopancréas, les muscles et l'organe lymphoïde, certaines lésions ont été observées. La présence d'inflammation, de nécrose, de nodules haemocytaires ainsi qu'une atrophie tubulaire de l'hépatopancréas ont pu être observées. Une vacuolisation des cellules R de l'hépatopancréas a également été constatée. Selon le nombre de vacuoles, une gradation de la vacuolisation a été faite.

Analyse par organe.

Les lésions constatées dans les différents tissus/organes ont été classées selon leur intensité en utilisant les critères illustrés dans le tableau 3.7. Le détail ainsi que les illustrations concernant cette classification sont donnés dans l'annexe 6.

DESCRIPTION DE LA LESION								
GRADE	Inflammation de l'hépatopancréas	Atrophie tubulaire de l'hépatopancréas	Vacuolisation des cellules R de l'hépatopancréas	Nodules haemocytaires dans l'hépatopancréas	Nécrose musculaire	Inflammation musculaire	Lésion à apparence calcifiée dans le muscle	Nodules haemocytaires dans l'organe lymphoïde
a	Absence d'inflammation	Absence d'atrophie	Peu à pas de vacuolisation	Absence de nodules haemocytaires	Absente	Absente	Absente	0
b	Infiltration haemocytaire modérée	Atrophie tubulaire focale	Vacuolisation clairement visible	Présence de 1 nodule haemocytaire	Quelques foyers nécrotiques	Infiltration haemocytaire modérée	Quelques lésions à apparence calcifiée à localisation focale	≤ 2
c	Infiltration haemocytaire prononcée	Atrophie tubulaire extensive	Quantité très importante de vacuoles	Présence de plus de 2 nodules haemocytaires	Nécrose plus extensive	Infiltration haemocytaire plus extensive	Lésions à apparence calcifiée plus nombreuses	2 < ≤ 5
d					Nécrose d'une partie substantielle du faisceau musculaire	Infiltration haemocytaire d'une partie substantielle du faisceau musculaire	Grandes lésions extensives à apparence calcifiée	5 < ≤ 7
e								> 7

Analyse du risque relatif.

Les lésions observées ont été classées en grades et une analyse de fréquence a été effectuée. Les résultats sont donnés en % dans le tableau 3.8.

Une inflammation importante (grades b et c) a été observée dans l'hépatopancréas des animaux nourris avec le méthylparathion MPAR (36,1%) et MPAR/V (32%) alors que les lésions étaient inférieures pour les groupes «acétonitrile» ou «*Vibrio*» (fréquences respectives de 18,9% et 26,4%). Aucun nodule haemocyttaire n'a été trouvé dans l'hépatopancréas ou l'organe lymphoïde des crevettes traitées à l'acétonitrile ou au MPAR. La fréquence des lésions à apparence calcifiée dans le muscle était également très faible (4,9% pour le MPAR, 0% avec l'acétonitrile).

Le nombre de nodules haemocytaires dans l'organe lymphoïde et dans l'hépatopancréas du traitement combiné MPAR/*Vibrio* a toujours été plus élevé que le nombre de nodules trouvé chez les crevettes ayant reçu le traitement *Vibrio* (cf. % en gras dans le tableau).

L'absence (grade a) ou la présence d'un faible nombre de vacuoles (grade b) dans les cellules R de l'hépatopancréas a été observée pour au moins 60 % des animaux de chaque traitement.

Tableau 3.8 : Fréquence par grade des lésions détectées (%)*.

		TRAITEMENT			
ORGANE	LESION/ grade	Acétonitrile	MPAR	Vibrio	MPAR/V
Hépatopancréas	Inflammation				
	a	81,1%	63,4%	73,7%	68%
	b	10,8%	17,1%	13,2%	20%
	c	8,1%	19,5%	13,2%	12%
	Atrophie				
	a	32,4%	26,8%	23,7%	8%
	b	43,2%	36,6%	34,2%	44%
	c	24,3%	36,6%	42,1%	24%
	Cellules R				
	a	16,2%	26,8%	36,8%	16%
	b	51,4%	48,8%	57,9%	44%
	c	32,4%	24,4%	5,3%	40%
Muscle	Nodule haemoc.				
	a	100%	100%	73,7%	68%
	b	0	0	21,1%	16%
	c	0	0	5,3%	16%
	Nécrose				
	a	43,2%	39,0%	28,9%	28%
	b	16,2%	12,2%	13,2%	8%
	c	35,1%	43,9%	28,9%	32%
	d	5,4%	4,9%	29,1%	32%
	Inflammation				
	a	35,1%	26,8%	10,5%	28%
	b	29,7%	9,8%	18,4%	36%
	c	32,4%	48,8%	28,9%	28%
	d	2,7%	14,6%	42,1%	8%
	Calcification				
	a	100%	95,1%	44,7%	60%
	b	0%	4,9%	2,6%	0%
	c	0%	0	23,7%	16%
	d	0%	0	29,0%	24%
Organe Lymphoïde	Nodule haemoc.				
	a	100%	100%	40%	26,3%
	b	0%	0	20%	21,1%
	c	0%	0	23,3%	26,3%
	d	0%	0	10%	10,5%
	e	0%	0	6,7%	15,8%

*Afin d'analyser le risque relatif seulement l'absence (a) ou la présence (b + c + d + e) de lésions était utilisée.

Les variables dichotomiques, réponses Oui /Non à la présence d'une lésion, ont été analysées comme décrit dans la section 2.4.2. Chaque traitement "acétonitrile, méthylparathion, *Vibrio*, et MPAR/Vibrio" a été considéré comme une variable d'exposition et les différentes lésions ont été considérées comme les variables d'issue. L'ensemble des résultats figure dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9 : Récapitulatif de l'analyse du risque relatif.

TRAITEMENT		LÉSIONS								
		Inflammation dans l'hépatopancréas	Atrophie tubulaire dans l'hépatopancréas	Vacuolisation des cellules R dans l'hépatopancréas	Nodules haemocytaires dans l'hépatopancréas	Nécrose musculaire	Inflammation musculaire	Vacuolisation musculaire	Lésion à apparence calcifiée dans le muscle	Nodules haemocytaires dans l'organe lymphoïde
Acétonitrile	RR* IC** p	0,55 0,266-1,12 0,115	0,97 0,76-1,24 1,0000	1,35 0,88-2,07 0,25	NP***	0,74 0,54-0,98 0,85	0,813 0,63-1,01 0,11	1,25 1,11-1,40 0,0036	NP	0,28 0,13-0,59 1,0000
Vibrio	RR IC p	0,82 0,45-1,49 0,65	1,09 0,87-1,36 0,59	1,35 0,88-2,07 0,25	3,4 1,45-7,94 0,0082	1,14 0,88-1,472 0,43	1,26 1,07-1,49 0,0156	0,97 0,82-1,16 0,98	4,74 2,59-8,68 0,0000014	1,8 1,27-2,44 0,0033
MPAR	RR IC p	1,44 0,87-2,38 0,23	1,03 0,824-1,289 0,96	0,69 0,41-1,18 0,21	NP	0,92 0,69-1,22 0,709	0,82 0,35-1,87 0,79	0,696 0,54-0,89 0,00020	0,15 0,039-0,63 1,000	0,65 0,41-1,04 0,081
MPAR/V	RR IC p	1,40 0,80-2,46 0,37	0,87 0,64-1,19 0,49	1,05 0,62-1,80 0,97	3,71 1,63-8,46 0,0044	1,14 0,86-1,52 0,53	1,00 0,78-1,27 0,81	1,20 1,06-1,35 0,0425	2,02 1,10-3,69 0,057	2,02 1,50-2,72 0,00023

* RR : Risque Relatif

** IC : Intervalle de confiance

*** NP : Non Présent

Le traitement à l'acétonitrile a pu être considéré comme un facteur de risque pour la lésion de vacuolisation dans le muscle. En effet, le ratio de risque a été de 1,25 (95% intervalle de confiance (IC) = 1,11-1,40; Fisher exact $p=0,0036$). Ceci implique que les crevettes traitées avec l'acétonitrile ont eu 1,25 fois plus de chance de développer de la vacuolisation dans le muscle que les crevettes qui n'ont pas reçu ce traitement. L'acétonitrile n'a été un facteur de risque pour aucune autre des lésions décrites précédemment. De plus, aucune section du lot « acétonitrile » n'a montré de nodules haemocytaires, ni dans l'hépatopancréas ni dans l'organe lymphoïde.

Le traitement MPAR n'a été un facteur de risque pour aucune des lésions observées. De plus, aucune section de ce lot n'a montré de nodules haemocytaires ni dans l'hépatopancréas ni dans l'organe lymphoïde.

Le traitement *Vibrio* a pu être associé à plusieurs types de lésions. Une association a été trouvée entre la présence de nodules haemocytaires dans l'hépatopancréas et ce traitement. Les crevettes recevant le traitement *Vibrio* ont été 3,4 fois plus susceptibles de développer des nodules haemocytaires dans l'hépatopancréas que les crevettes n'ayant pas reçu ce traitement (Ratio de risque 3,39, 95% IC = 1,45-7,94; χ^2 Yates corrected, $p=0,0082$). De la même façon, le traitement *Vibrio* a pu être associé à la présence de nodules haemocytaires dans l'organe lymphoïde. Les crevettes ayant reçu ce traitement ont été 1.8 fois plus susceptibles de développer cette lésion que celles qui n'ont pas reçu ce traitement (Ratio de risque (RR) : 1,76, 95% IC = 1,27-2,44; χ^2 Yates corrected, $p=0,0033$). De plus le traitement *Vibrio* a pu être associé à la présence d'inflammation dans le muscle (RR=1,26, 95% IC = 1,07-1,49; Fisher exact, $p=0,0156$) et à la présence de lésions à apparence calcifiée dans le muscle (RR=4,74, 95% IC = 2,59-8,68; χ^2 Yates corrected, $p=0,0000014$).

Aucune autre association n'a été trouvée entre le traitement *Vibrio* et les lésions précédemment décrites. Etant donné que les associations « nodules haemocytaires dans l'hépatopancréas » et « nodules haemocytaires dans l'organe lymphoïde » observées avec le traitement *Vibrio* n'ont été trouvées ni dans le traitement MPAR ni dans le traitement acétonitrile, on peut conclure que ces lésions étaient dues à l'injection de *Vibrio*.

Dans le traitement où les crevettes ont été exposées à la fois au pesticide à *Vibrio parahaemolyticus*, des associations ont été trouvées. La présence de nodules haemocytaires

dans l'hépatopancréas a pu être associée à ce traitement (RR : 3,71, 95% IC = 1,63-8,46; χ^2 Yates corrected p= 0,0044). De la même façon, ce traitement combiné MPAR/*Vibrio* a été associé à la présence de nodules haemocytaires dans l'organe lymphoïde (RR : 2,02, 95% IC = 1,50-2,72; Fisher exact, p= 0,00023). Ce traitement a également été associé aux lésions à apparence calcifiée présentes dans le muscle (RR : 2,02, 95% IC = 1,10-3,69; χ^2 Yates corrected p=0,057). Cette association a également été trouvée dans le traitement *Vibrio*. L'association trouvée avec le traitement combiné MPAR/*Vibrio* a été deux fois moins forte (RR : 2,02, IC = 1,10-3,69) que celle trouvée dans le traitement au *Vibrio* seul (RR=4,74 IC = 2,59-8,68). Les lésions trouvées dans les deux traitements ont été comparées en utilisant un test de proportion. Néanmoins, ce test n'a pas montré de différence significative entre les deux traitements. La proportion d'animaux présentant la lésion "nodules haemocytaires dans l'hépatopancréas" dans le traitement *Vibrio* n'a pas été significativement différente de la proportion d'animaux présentant la même lésion dans le traitement combiné MPAR/V (p=0,6259). De la même façon, les proportions d'animaux présentant les lésions " nodules haemocytaires dans l'organe lymphoïde " et "lésions à apparence calcifiée" n'ont pas montré de différence significative entre les traitements (p=0,3143 et 0,2393 respectivement). La dernière association trouvée a été MPAR/*Vibrio* et vacuolisation dans le muscle, avec un risque relatif de 1,20 (95% IC = 1,06-1,35; Fisher exact p= 0,0425). Ce risque relatif est du même ordre de grandeur que celui se rapportant à la même lésion dans le traitement acétonitrile (RR=1,25, 95% IC = 1,11-1,40; Fisher exact p=0,0036).

4. Discussion.

4.1. Marquage de *Vibrio parahaemolyticus* par la fluorescence.

L'utilisation du colorant fluorescent (DTAF) pour marquer les bactéries afin de suivre la progression de *Vibrio* dans les crevettes n'a pas semblé être une technique adéquate. Le DTAF a été utilisé dans d'autres études pour le marquage de micro-sphères en matière plastique, de bactéries tuées par la chaleur, d'algues, de particules mortes, de matériel organique et de levures afin de déterminer les taux d'absorption de ces éléments dans le milieu aquatique ; Balczon et Pratt, 1995; Reiter, 1997;).

Dans la première expérience, la fluorescence des bactéries marquées a pu être observée sur les sections colorées avec le DAPI, l'éosine et sur les tissus non colorés mais n'a pas pu être observée en utilisant l'haematoxyline. Néanmoins, dans une deuxième expérience, utilisant des grossissements plus importants (x100), il a été impossible de mettre en évidence les bactéries. Il est possible que la fluorescence qui a été observée dans la première expérience soit non spécifique. Cette fixation non spécifique de la fluorescence aurait pu être causée par le détachement de la fluorescéine des bactéries pendant la période de préparation et la procédure de coloration des tissus pour l'histologie.

Afin de conclure définitivement quant à l'utilisation du DTAF pour suivre la progression des bactéries, des expériences complémentaires devraient être réalisées. En premier lieu, les bactéries marquées devraient être examinées afin de s'assurer que le DTAF est réellement fixé. Par la suite, un contrôle négatif (crevettes injectées avec des bactéries non fluorescentes) et un contrôle positif (constitué d'une injection de fluorescéine sans bactéries) devraient être utilisés. Ces études permettraient également de déterminer si la fluorescence n'est pas "dégradée" lors de la préparation des tissus pour l'histologie.

En cas de résultats satisfaisants, la disparition de la fluorescence dans les tissus au-delà des 24h aurait pu être due soit à la dégradation naturelle (photo dégradation), soit à la division des bactéries. En effet, sachant que le temps de génération de *Vibrio parahaemolyticus* peut être de 30 minutes à quelques heures, la fluorescence a pu décroître par simple division des bactéries. Ainsi le suivi de la progression des bactéries reste de toute manière délicat à réaliser. De plus, des inconnues persistent quant au devenir des bactéries mortes marquées : gardent-elles le même niveau de fluorescence ? la fluorescence se détache-t-elle pour s'attacher aux tissus ?

D'autres techniques comme l'immunohistochimie ont été utilisées afin de suivre la progression et la distribution de bactéries. Des techniques indirectes basées sur l'utilisation d'anticorps fluorescents (IFAT : indirect fluorescent antibody technique) à base de fluorescéine ont été développées pour la détection de *Vibrio parahaemolyticus*. De même, l'incorporation et l'évolution de *Vibrio anguillarum* dans *Artemia franciscana* ont été mesurées en utilisant un test ELISA. L'utilisation de ce type de méthode aurait peut-être donné de meilleurs résultats dans notre étude. Néanmoins, sachant que des bactéries du genre *Vibrio* sont naturellement présentes dans les crevettes, il sera toujours difficile de déterminer si les bactéries mises en évidence par l'une ou l'autre de ces techniques proviennent de l'injection ou si elles étaient déjà présentes avant. De plus, ces techniques ne permettent pas de déterminer si les bactéries mises en évidence sont mortes ou vivantes.

Une méthode alternative consiste en l'utilisation de protéines fluorescentes vertes (GFP : green fluorescent protein) (Ying et Chengping, 2000). La GFP est isolée à partir de la méduse *Aequorea victoria* en utilisant la technologie de l'ADN recombinant. La GFP est une petite protéine cytoplasmique ayant une faible toxicité et se synthétisant en continu. La séquence codant pour la GFP peut être combinée avec celui d'autres protéines pour créer des protéines de fusion fluorescentes. La GFP apporte des avantages uniques de molécule porteuse, comme sa capacité d'expression dans de nombreux types cellulaires différents sans ajout d'autres substrats ou cofacteurs. La fluorescence de la GFP est stable et directement détectable (Anu Kondepudi, 2000). L'utilisation de ce produit pour les expériences de localisation des bactéries permettrait donc de minimiser les effets de la réplication bactérienne aboutissant à la dégradation de la fluorescence observée dans cette étude (Abelson et Melvin, 1999).

4.2. Coloration des tissus.

L'objectif principal de cette étude était de réaliser une visualisation simultanée des tissus et des bactéries marquées avec le DTAF. Aucun des colorants utilisés n'a semblé être satisfaisant. Les sections colorées avec l'haematoxyline se sont avérées trop foncées, ce qui masquait la fluorescence des bactéries. L'éosine a rendu les tissus entièrement fluorescents et a donc masqué la fluorescence des bactéries. L'éosine est un dérivé tétra-bromé de la fluorescéine (Drury et Wallington, 1980; Woods et Ellis, 1996). Cela peut permettre d'expliquer la fluorescence des tissus observée.

Le colorant DAPI semblait prometteur dans la première expérience, mais n'a finalement pas produit les résultats attendus. Ceci peut être dû au fait qu'aucun filtre spécial n'a été utilisé

pour observer les sections colorées. En effet, la visualisation du colorant DAPI nécessite l'utilisation d'une lumière ultraviolette alors que le DTAF doit être observé sous une lumière bleue. De plus, une digestion par la ribonucléase aurait pu être utilisée pour améliorer la clarté de la section (le DAPI se lie de façon spécifique à des polymères linéaires contenant des phosphates comme les poly phosphates de l'ADN) (Coleman, 1979). Dans le passé, le DAPI avait été utilisé pour établir l'empreinte photo de l'ADN (Jeppesen et Nielsen, 1989), et la coloration de l'ADN d'organismes unicellulaires comme des ciliés, bactéries et flagellés .

4.3. Toxicité sub-létale du méthylparathion.

4.3.1. Utilisation de l'exposition orale.

Traditionnellement, la voie la plus commune d'exposition d'animaux aquatiques à un polluant se fait à travers l'eau (Vogt, 1987; Kristin, 1990; Srinivasulu *et al.*, 1990; Srinivasulu et Ramana-Rao, 1991, et Betancourt-Lozano, 1999). Dans ce travail, une administration orale du pesticide a été jugée préférable. En effet, les crevettes ayant une vie benthique et se nourrissant directement sur le sol, il est tout à fait possible qu'elles subissent une contamination par voie orale. De plus, le méthylparathion est relativement insoluble dans l'eau (Badawy et El-Dib, 1984; Hertel, 1993) et est lié aux sédiments. L'analyse des crevettes, de l'eau et des sédiments d'un lagon du Golfe de Californie, Galindo-Reyes a ainsi révélé des concentrations de méthylparathion beaucoup plus élevées dans les sédiments que dans l'eau (concentrations de 98.68 ng/g de méthylparathion dans les sédiments et 4,04 ng/g de méthylparathion dans l'eau).

Le méthylparathion étant très peu hydrosoluble, un solvant a dû être employé afin de fabriquer les aliments contaminés. Dans une étude précédente (données non publiées, Abad-Rosales, 2000), différents solvants (eau distillée, acétone, acétonitrile, éthanol, et propylène glycol) ont été testés. L'acétonitrile a été retenu car il donnait les résultats les plus satisfaisants. Ce composé se volatilise rapidement ce qui limite le risque d'un effet toxique. Dans cette étude, comme dans l'étude faite par Abad-Rosales (2000), aucune mortalité n'a été observée ni pendant, ni après l'alimentation avec des croquettes contenant le solvant. Par ailleurs, l'acétonitrile ne semble pas affecter la stabilité du méthylparathion.

Il est judicieux de s'interroger sur la différence entre la quantité de méthylparathion voulue et la quantité exacte de méthylparathion effectivement contenue dans la nourriture. Même si la concentration nominale a été calculée, la véritable quantité de méthylparathion adsorbée par les croquettes n'a pas pu être déterminée. Il est possible qu'une partie du méthylparathion se soit évaporée en même temps que le solvant lors de la préparation des croquettes. Toutefois, Abad-Rosales (2000) a montré l'existence d'une relation linéaire entre la concentration nominale et la véritable concentration de méthylparathion.

4.3.2. Détermination d'une dose sub-létale de méthylparathion.

Dans notre première étude, la dose sub-létale du méthylparathion pour les crevettes blanches n'ayant pas pu être définie, une dose de $6,48\mu\text{g MPAR.g}^{-1}$ d'aliment a été choisie afin d'étudier l'interaction MPAR/*Vibrio*. Cette dose de $6,48\mu\text{g MPAR.g}^{-1}$ a toutefois toujours causé une légère mortalité.

Les tests de toxicité aiguë fournissent un outil de criblage pour l'évaluation de la toxicité relative de différents produits chimiques et la détermination des concentrations limites supérieures produisant des effets toxiques (Parrish, 1985). Néanmoins, la signification écologique des tests de toxicité aiguë peut être remise en cause puisque les concentrations létales aiguës sont souvent beaucoup plus élevées que les concentrations ayant un effet à long terme. Les tests de toxicité sub-létale ou chronique sont réalisés pour évaluer l'effet d'un produit chimique sur la survie et la capacité des animaux à se reproduire. Ils permettent des prédictions qui seront écologiquement plus parlantes que les tests de toxicité aiguë. Cette étude pourrait être un point de départ pour des études ultérieures utilisant des doses de méthylparathion moins importantes mais à plus long terme. Il est difficile de comparer les résultats obtenus avec d'autres études existantes, ces dernières utilisant une exposition par l'eau et non une exposition orale (Vogt, 1987; Kristin, 1990; Reddy *et al.*, 1990; Srinivasulu et Ramana-Rao, 1991, et Betancourt-Lozano, 1999).

4.3.3. Effets généraux du méthylparathion sur *Litopenaeus vannamei*.

Rapidement, des comportements anormaux (non-quantifiés), avec notamment de l'hyperexcitabilité, de la natation erratique, des cognements contre les parois et de la natation en cercle, ont été observés quelques minutes après l'exposition orale au MPAR. Une réponse de fuite anormalement présente a été observée chaque fois que l'animal rentrait en contact avec un obstacle. Par la suite, une léthargie était observée, les crevettes se positionnaient sur le fond des aquariums, couchées sur le côté ou sur le dos, immobiles, ne remuant que leurs pléopodes avant de mourir. Quelques crevettes traitées avec $19,04\mu\text{g MPAR.g}^{-1}$ et $6,48\mu\text{g MPAR.g}^{-1}$ ont montré une coloration blanchâtre et une opacification de la musculature de leurs segments abdominaux. D'autres auteurs ont eu les mêmes observations (Reddy, 1986; Reddy, 1988; Betancourt-Lozano, 1999). Cette opacité musculaire est probablement due à l'accumulation d'acide lactique dans le muscle (Reddy et Rao, 1988). Ce composé a pu être formé par métabolisme anaérobie dans le muscle. Ce métabolisme anaérobie peut avoir de nombreuses causes comme le stress causé par le nettoyage régulier des aquariums, l'alimentation individuelle mais aussi par une contraction musculaire excessive causée par le pesticide. N'ayant pas été observée dans les groupes de contrôle, il est raisonnable de penser que cette anomalie a été causée par le MPAR.

Dans l'expérience finale, un nombre important d'animaux morts prélevés le lendemain de l'injection des bactéries présentait un corps mou, des mues étaient retrouvées dans plusieurs aquariums. Cet effet n'a pu être quantifié puisque les crevettes en avaient mangé une partie. Un nombre important de mues peut être une indication de stress. Il n'y a que dans les aquariums contenant les animaux infectés par les *Vibrio* que cet effet a été remarqué. Il est donc probable que c'est le stress causé par le développement de la vibriose et non celui causé par l'injection qui a déclenché la mue des crevettes.

4.3.4. Mortalités induites par l'exposition au méthylparathion.

Les mortalités observées après l'exposition des crevettes au méthylparathion sont apparues dépendantes de la dose. En effet, les mortalités les plus importantes ont été obtenues pour les concentrations les plus élevées en MPAR dans l'aliment ($96,66\%\pm 13,3$ de mortalité avec $19,04\mu\text{g MPAR.g}^{-1}$, $16,66\%\pm 5,7$ de mortalité avec $6,48\mu\text{g MPAR.g}^{-1}$, et aucune mortalité

avec 2,7 μ g, 4,04 μ g et 5,66 μ g MPAR.g⁻¹). Cette même relation a été démontrée par Abad-Rosales (Abad-Rosales, 2000). Etant donné qu'aucune mortalité n'a été remarquée dans les groupes de contrôle (acétonitrile et contrôle), on peut penser que les mortalités observées ont été provoquées par le pesticide.

4.4. Détermination de l'activité enzymatique de l'acétylcholine estérase (AChE).

Le principal mode d'action des pesticides organophosphorés est l'inhibition de l'activité de l'acétylcholine estérase, cette activité a donc été mesurée sur les animaux exposés et témoins. Les yeux des crevettes ont été choisis plutôt que le muscle en raison de résultats non publiés de Bautista-Covarrubias (Bautista-Covarrubias, 2001). Dans son étude, les activités AChE mesurées étaient six fois plus élevées dans les yeux que dans le muscle (les yeux et les pédoncules oculaires sont majoritairement constitués de tissus nerveux). De plus, le muscle pouvait ainsi être gardé intact pour l'examen histologique.

Dans les études préliminaires aucune inhibition significative de cette activité n'a été détectée. Bien que les crevettes nourries avec 19,04 μ g MPAR.g⁻¹ aient montré une faible diminution de l'activité AChE, une analyse statistique révèle que les différences ne sont pas significatives ($U=3$, $p>0,05$). Cet effet pourrait résulter du faible nombre d'animaux. En effet, de fortes variations individuelles ont été observées (activités entre 3,20 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ et 15,88 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ au sein d'un même lot). Ces variations peuvent s'expliquer par une réponse individuelle au pesticide, une prise de nourriture inégale entre les différents individus ou encore une faible répétitivité de la technique.

Dans l'étude finale, l'activité a été mesurée 24h et 120h après le dernier repas de pesticide.

La mesure effectuée 24h après le dernier repas n'a révélé aucune inhibition bien que des mortalités aient été enregistrées.

Lors de la mesure effectuée 120h après le dernier repas, bien que le nombre d'animaux prélevés ait été plus important, un résultat similaire a été obtenu. Néanmoins, l'alimentation avec le pesticide ayant été arrêtée 120h auparavant et aucune mortalité n'ayant été observée chez les crevettes nourries avec le méthylparathion seul (MPAR), il est possible que le pesticide n'ait plus d'effet sur cette activité enzymatique.

Signalons pour finir que d'autres facteurs pourraient expliquer l'absence d'inhibition observée. En premier lieu, une erreur de manipulation à un certain stade du procédé pourrait être la cause de l'absence de détection de l'inhibition. Néanmoins, une certaine activité a été

enregistrée dans tous les échantillons ce qui suggère que la technique fonctionnait correctement. Un contrôle positif, qui aurait pu consister en un homogénat de tissus à valeur élevée en activité AChE comme de la cervelle de poisson, aurait permis de préciser ce point.

Il convient également de préciser que toutes les mesures ont été faites sur des animaux survivants. Il est donc possible qu'aucun de ces animaux n'ait présenté une forte inhibition de leur activité AChE et que pour cette raison ils aient survécu. Il aurait peut-être été plus judicieux de prélever des animaux moribonds comme cela a été fait lors de l'évaluation de la concentration de 19,04 $\mu\text{g MPA}\cdot\text{g}^{-1}$. La mortalité et les comportements anormaux sont généralement observés lorsque l'activité enzymatique est inhibée entre 50 et 60%. Il est donc très difficile de déterminer l'inhibition puisqu'une inhibition au-delà de 60% cause la mort de l'animal (George S., Pers. Com., 2001).

L'activité acétylcholinestérasique est largement utilisée comme bio marqueur afin de détecter la pollution (Kristin, 1990; ; Wolff *et al.*, 1992; Reddy et Philip, 1994; ;). Néanmoins, cette activité est susceptible de varier sous l'action de différents facteurs comme l'exposition à d'autres produits chimiques (par exemple le mercure), des conditions physiologiques détériorées (par exemple la sous-nutrition), ou le stress (Hertel, 1993). De plus, l'inhibition de l'activité AChE est dépendante de l'activation du méthylparathion en méthylparaoxon, forme biologiquement active du pesticide. Toute inhibition de l'activation du méthylparathion par les mono-oxygénases (comme le P450) peut influencer sa toxicité (Hertel, 1993). Signalons que certaines formulations associent le méthylparathion au pipéronyl butoxide, ceci afin d'augmenter la toxicité du méthylparathion chez les insectes en induisant l'activité P450. Il serait donc souhaitable et intéressant de compléter cette étude par une étude comparative utilisant du méthylparaoxon.

4.5. Effet du méthylparathion sur la sensibilité de la crevette blanche à la vibriose.

4.5.1. Choix du mode d'exposition.

La voie d'administration des bactéries choisie dans cette étude a été l'injection. La technique de l'injection est l'une des plus utilisés en infection expérimentale pour les études de pathogénicité de bactéries . Les avantages de cette technique sont sa reproductibilité ainsi que le contrôle et le comptage des bactéries inoculées. Le désavantage de cette technique est qu'elle ne reflète pas l'infection naturelle. Des études ultérieures devront être conduites en

utilisant l'immersion comme voie d'administration des bactéries afin de se rapprocher des infections naturelles.

La dose de HL57 utilisée (10^5 CFU/ml) a été basée sur des résultats répétables obtenus au préalable dans le centre avec la même souche (Abad-Rosales, 2000).

4.5.2. L'interaction méthylparathion-*Vibrio*.

La combinaison de l'exposition orale avec le méthylparathion et l'injection de *Vibrio parahaemolyticus* révèle une augmentation de la mortalité en accord avec des études précédentes (Abad-Rosales, 2000).

Afin d'examiner cette interaction, une analyse histologique a été conduite sur tous les animaux survivants des différents groupes : acétonitrile, MPAR, *Vibrio* and MPAR/*Vibrio*. Aucune anomalie n'a été observée dans la glande antennale, le système nerveux, le cœur, le tissu haématopoïétique, les intestins, et l'estomac. Par contre, dans d'autres organes comme l'hépatopancréas, les muscles et l'organe lymphoïde, de l'inflammation, de la nécrose, la présence de nodules haemocytaires et une atrophie tubulaire de l'hépatopancréas ont pu être observées.

L'analyse du risque relatif, basé sur la réponse « absence ou présence d'une lésion », a montré des résultats intéressants. Le risque relatif donne à la fois une indication sur l'existence d'un lien de cause à effet et la force de cette association. Plus les facteurs sont reliés, c'est-à-dire plus le risque relatif est important, plus la mise en place d'une stratégie pour contrôler ce facteur de risque sera efficace.

Les crevettes ayant reçu le traitement *Vibrio* ont été 3,39 fois plus susceptibles de développer des nodules haemocytaires (NH) dans l'hépatopancréas et 1,76 fois plus susceptibles de les développer dans l'organe lymphoïde que les crevettes ayant reçu un traitement différent.

La présence de nodules haemocytaires a été décrite comme une lésion de vibriose (Semarnap, 1999). La présence de nodules multi-focaux, mélanisés ou non, avec des centres septiques, est considérée comme principal élément diagnostique de vibriose systémique (Lightner, 1996). Aucune de ces lésions n'a été observée ni parmi les crevettes du groupe MPAR ni parmi celles nourries avec l'acétonitrile.

Bien que la cause spécifique de la mort des animaux n'ait pas été vérifiée dans les expériences elle peut être déduite en comparant les groupes contrôles et traités. Aucune conclusion

n'aurait pu être tirée en prélevant des animaux morts puisqu'ils auraient été envahis par n'importe quelle bactérie présente dans l'eau et l'autolyse rapide les aurait rendus inutilisables pour l'histologie. Une coloration Gramme aurait pu être effectuée pour mettre en évidence les bactéries dans les sections d'histologie mais n'aurait pas apporté un diagnostic définitif.

L'inflammation dans le muscle ainsi que les lésions à "apparence calcifiée" ont été associées avec le traitement *Vibrio*. Des risques relatifs significatifs de 1,26 et 4,74 respectivement ont été obtenus. La localisation de ces lésions était plus ou moins constante et souvent mise en évidence dans le muscle des segments abdominaux ce qui correspond probablement au site d'injection. La nature précise de cette lésion à "apparence calcifiée", hautement éosinophile, trouvée dans le muscle aurait pu être vérifiée par la méthode modifiée de von Kossa, ou l'utilisation d'Alizarin rouge S (colorants spécifiques du calcium) (Woods, 1996; Drury, 1980). Le délai de 4 jours après l'injection suggère une période trop courte pour le développement d'une calcification extensive et il est également plus probable que la lésion observée soit en fait de la nécrose hyaline, lésion d'aspect identique.

Les crevettes du traitement combiné MPAR/*Vibrio* ont été 3,71 fois plus susceptibles de développer des NH dans l'hépatopancréas et 2,02 fois plus susceptibles de développer des NH dans l'organe lymphoïde que les crevettes des autres lots. Ces risques relatifs sont du même ordre de grandeur que ceux observés dans le traitement *Vibrio*. De plus, le nombre de nodules haemocytaires dans l'organe lymphoïde a été plus important dans le traitement combiné que dans le traitement *Vibrio*. A ce stade, on peut conclure que l'apparition de ces lésions est légèrement plus probable dans le traitement combiné. De plus les lésions semblaient plus intenses dans le traitement combiné. Néanmoins, lorsque des lésions similaires ont été trouvées dans les deux traitements *Vibrio* et MPAR/*Vibrio*, les tests de proportion n'ont pas montré de différence significative. L'absence de significativité peut être due au fait qu'il n'y a pas de différence mais également au fait que le nombre d'animaux prélevés était trop faible pour détecter une telle différence. Il semble que *Vibrio* soit capable de se développer légèrement plus facilement lorsque les crevettes sont nourries avec le pesticide. L'organophosphoré a pu causer un stress physique (contraction musculaire spastique) et a pu avoir une répercussion directe ou indirecte sur le système de défense de l'organisme, augmentant ainsi les possibilités d'infection.

Des études histopathologiques ont également été réalisées dans les conditions naturelles. Vogt (1987) a décrit une désorganisation de l'hépatopancréas, détachement des cellules de la lame

basale, un manque de réserves lipidiques et de nombreuses cellules autolysées dans *P. monodon* après l'exposition de celles-ci au diméthoate. De même, Ranga Rao et Doughtie (1984) ont exposé des crevettes (grass shrimp) à différents produits toxiques incluant les dithiocarbamates (même mode d'action que le méthylparathion), et rapportent une hypertrophie épithéliale de l'hépatopancréas, avec vacuolisation cytoplasmique et diminution du réticulum endoplasmique basal tubulaire ainsi que des mitoses anormales.

En ce qui concerne la vacuolisation des cellules R de l'hépatopancréas, une consommation *ad libitum* se traduit généralement par une forte vacuolisation, signe d'une accumulation de réserves. Le manque de vacuolisation dans les cellules R de l'hépatopancréas observé dans cette étude sur l'ensemble des animaux peut être lié au régime alimentaire, les animaux n'ayant pas été nourris *ad libitum*. Les cellules R de l'hépatopancréas sont un bon indicateur du statut nutritionnel d'une crevette puisque ce sont les cellules de stockage. Elles absorbent les nutriments solubles à partir du lumen de l'intestin et stockent les lipides et le glycogène dans les vacuoles (Al-Mohanna et Nott, 1987). Dans notre étude, deux croquettes de 0,00817 ($\pm 0,00198$) g ont été données par jour. Le régime normal d'alimentation d'une *penaeus* juvénile est de 6-10% du poids du corps. Avec un poids moyen de 0,75g, la quantité de nourriture donnée a donc été insuffisante. Ceci pourrait expliquer l'atrophie tubulaire de l'hépatopancréas ainsi que la diminution du nombre des vacuoles dans les cellules de la plupart des individus. Signalons de plus que la cytologie de l'hépatopancréas varie avec le cycle de la mue. Au début de la phase de l'inter mue, il y a une quantité restreinte de lipides dans les cellules R alors que ces réserves sont maximales au début de la pré mue (Al-Mohanna et Nott, 1989). Le cycle de mue n'a pas été pris en compte dans cette expérience. Néanmoins, sachant que le cycle à ce stade de développement est de 8-9 jours, tous les animaux ont dû muer au moins une fois pendant l'expérience. En conséquence, dans chacun des traitements il y a eu des animaux à tous les stades dans le cycle de mue. C'est pourquoi cette lésion a pu être trouvée dans tous les lots sans être associée à un traitement particulier.

L'acétonitrile a été un facteur de risque pour la vacuolisation dans le muscle. Le facteur de risque a été de 1,25. Cette même association a été trouvée dans le traitement combiné (MPAR/V). La vacuolisation du muscle n'a pas été observée de manière consistante dans les différents traitements et n'a pas donné d'associations logiques. Si la vacuolisation du muscle était due à l'acétonitrile, une association aurait dû être trouvée pour les autres traitements utilisant ce même aliment c'est à dire le traitement *Vibrio*. Il semble donc peu probable que la

vacuolisation dans le muscle ait été due à l'acétonitrile. Une autre explication serait que la vacuolisation du muscle était due à une autolyse post mortem. Comme expliqué dans les matériels et méthodes, avant la fixation, 20 crevettes ont été prélevées pour l'activité AChE. Pour cela ces crevettes ont été placées sur de la glace afin de stopper toute activité enzymatique, ainsi elles n'ont pas été fixées immédiatement. Les crevettes des groupes acétonitrile et MPAR/V étant les premières prélevées, elles sont peut-être restées un peu plus longtemps sur la glace puisque tout n'était pas prêt à ce moment-là pour les préparer.

Les lésions ont été classées selon des grades et les fréquences ont été calculées. Une inflammation plus intense a été trouvée dans l'hépatopancréas (grades b et c) dans les animaux traités avec le MPAR et MPAR/*Vibrio*. Cette inflammation peut être due à une irritation liée à l'aliment contenant le méthylparathion. Néanmoins, aucun facteur de risque n'a pu être décelé. Des signes d'inflammation ont été trouvés dans tous les traitements ce qui suggère l'intervention d'autres facteurs. Dans tous les lots, la nourriture ayant été préparée avec l'acétonitrile, il est possible que l'inflammation ait été causée par ce composé. L'exclusion de cette hypothèse aurait pu être réalisée par l'analyse d'animaux nourris avec de l'aliment normal.

En conclusion, on peut dire que l'infection avec *Vibrio* a reproduit la maladie et que le nombre de NH a été plus élevé dans le traitement combiné que dans les autres traitements. Il en va de même pour la mortalité. Les autres lésions observées n'ont pu être expliquées ou associées à aucun des traitements.

Recommandations à venir:

Il serait utile de compléter cette étude par une étude comparative entre la formulation commerciale et la forme pure du méthylparathion.

De plus, une exposition par les sédiments pendant des périodes plus longues et en utilisant des concentrations sub-létales de pesticide similaires à celles trouvées dans l'environnement devrait être examinée.

En dernier lieu, l'exposition des crevettes au pathogène par immersion devrait être évaluée.

LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

- Abad-Rosales, S.M.A. (2000) Exposicion del camaron blanco *litopenaeus vannamei* al organofosforado metilparation y su efecto sobre el proceso de infeccion de una cepa bacteriana de *Vibrio parahaemolyticus*. Centro de investigacion en alimentacion y desarrollo, A.C, 2000.
- Abelson N.J. et Melvin I.S. (1999). Green fluorescent protein in the measurement of bacteria-host interactions In: *Methods in Enzymology* (ed. by L.E. Bermudez, F.J. Sangari and A. Parker), pp. 285-295. Michael Conn. Academic press. California
- Advances in World Aquaculture (1991) *Marine Shrimp Aquaculture in Mexico: Current status*. In: Shrimp Culture in North America and the Caribbean (ed. by A.F. Tom and E.A. Garmendia Nunez), pp. 70-82. Paul A. Sandifer.
- Al-Mohanna S.Y. et Nott J.A. (1989) Functional cytology of the hepatopancreas of *P. semisulcatus* during the moult cycle. *Marine Biology* **101**, 535-544.
- Al-Mohanna S.Y. et Nott J.A. (1987) R-cells and the digestive cycle in *P. semisulcatus*. *Marine Biology* **95**, 129-137.
- Anonymous (1991) Estados Unidos Mexicanos, Panorama Agropecuario VII Censo Agropecuario . *Instituto Nacional de Estadistica Geographia e Informatica* 191
- Anu Kondepudi.(2000) "# 61: Green Fluorescent Protein Applications" Molecular Dynamics. Retrieved June 2001 from the World Wide Web: URL: <http://www.mdyn.com/app>
- Badawy M.I. et El-Dib M.A. (1984) Persistence and fate of methylparathion in sea water. *Bulletin of environ. Cotam. Toxicol.* **33**, 40-49.
- Balczon J.M. et Pratt J.R. (1995) A comparison of methods for estimating short-term feeding rates of algivorous ciliated protozoa. *Archiv fuer Protistenkunde* **146**, 49-58.
- Bautista-Covarrubias, J.C. (2001) Inhibicion de la actividad de AChE, como efecto de toxicidad por insecticidas organofosforados sobre camaron blanco, *Litopenaeus vannamei*. Centro de investigacion en alimentacion y desarrollo, A.C, 2000.
- Bell, A.B. et Lightner, D.V. (1988) *A handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*, World aquaculture society, Aquaculture Development program. Hawaii.

- Bergh O., Vikanes L., Makridis P., Skjermo J., Knappskog D. et Rodseth O.D. (2001) uptake and processing of a *Vibrio anguillarum* bacterin in *Artemia franciscana* measured by ELISA and immunohistochemistry. *Fish and Shellfish Immunology* **11**, 15-22.
- Betancourt-Lozano, M. (1999) Interactive toxicity of a triazol-derivate fungicide and an organophosphate pesticide in the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. University of Stirling.
- Bitton G., Rhodes K., Koopman B. et Cornejo M. (1995) *Water Environment Research* **67**, 290-293.
- Bodhipaksha N., Perkins B A W. (1999) The effects of methylparathion on the phagocytosis and respiratory burst activity of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) phagocytes. In: *Models for Environmental Toxicological Biomarkers, immunostimulators* (ed. by J S Sholen and T C Fletcher), **1**, pp. 11-22.
- Botanical Institute (2000) Mitosis, cell wall and flagella synthesis in synchronized cultures of the prasinophyte, *Scherffelia dubia*. *Journal of Phycology* **36**, 71-72.
- Boyd C.E (1999) Aquaculture sustainability and environmental issues. *World Aquaculture* **30**, 10-13.
- Brett (1957). Epidemiology course In: *MSc course Aquatic veterinary studies. 2000-2001* (by J.F Turnbull.)
- Chanratchakool, P., Turnbull, J.F., Funge-Smith, S.J., Mac Rae, I.H. et Limsuwan, C. (1998) *Health management in shrimp ponds*, third edn. Aquatic Animal Health Institute. Thailand.
- Chiou A., Chen L.H. et Chen S.K. (1991) Foodborn illness in Taiwan 1981-1989. *Food Aust.* **43**, 70-71.
- Coleman A. (1979) Use of the fluorochrome 4'6-diamino-2-phenylindole in genetic and developmental studies of chloroplast DNA. *Journal of Cell Biology* **82**, 299-305.
- Couch J.A. (1978) Diseases, parasites, and toxic responses of commercial penaeid shrimp of the gulf of Mexico and South Atlantic coast of North America. *Fishery bulletin* **76**, 1-44.

- Couch J.A. et Courtney L. (1977) Interaction of chemical pollutants and virus in a crustacean: a novel bioassay system. *Annual N.Y. Acad. Sci.* **298**, 497-504.
- Cowan, S.T. et Steel, K.J. (1993) *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria*, third edn. Barrow, G.I.// Felthman, R.K.A. Great Britain, Cambridge.
- DeLong E.F., Taylor L.T., Marsh T.L. et Preston C.M. (1999) Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 5554-5563.
- Drury, R.A.B. et Wallington, E.A. (1980) *Carleston's histological technique*, Fifth edn. Oxford medical publications, Oxford university press. Oxford.
- Ellman G.L., Diane Courtney K., Valentino Andres et M. Featherstone R. (1961) A new and rapid colometric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**, 88-95.
- EXTONET C.U.(1998) "Pesticide information profile Methylparathion". Extension Toxicology Network, Cornell University, NY, USA. Retrieved June 2001 from the World Wide Web: [Http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/haloxyp-methyl-parathion/methyl-parathion-ext.html](http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/haloxyp-methyl-parathion/methyl-parathion-ext.html)
- FAO (2001)"Shrimp analysis-January 2001" Retrieved June 2001 from the World Wide Web: <http://www.globefish.org/publications/commodityupdate/200101/200101.htm>
- Flegel T.W., Fegan D.F., Kongsom S., Vuthikomudomkit S., Sriurairatana S. et Boonyaratpalin (1992) Occurrence, Diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. In: *Disease of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States* (ed. by W. Fulks and K.L. Main), pp. 57-112. Oceanic institute. Honolulu
- Frias-Espéricueta M.G., Harfush-Mendelez M. et Paez-Osuna F. (2000) Effects of Ammonia on Mortality and Feeding of Postlarvae Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **65**, 98-103.
- Galindo-Reyes J.G., Fossato V.U., Villagrana-Lizarraga C. et Dolci F. (1999) Pesticides in water, sediments, and shrimp from a coastal lagoon off the Gulf of California. *Marine*

- pollution Bulletin* **38**, 837-841.
- Gomez-Gill B., Tron-Mayen L., Roque A., Turnbull J.F. et Inglis V.G.-F.A.L. (1998) Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **163**, 1-9.
- Hebel D.K., Jones M.B. et Depledge M.H. (1997) Responses of Crustaceans to contaminant exposure: a holistic Approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **44**, 177-184.
- Herbert A., Guilhermino L., Da Silva de Assis H.C. et Hansen P.D. (1995) AChE activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Zeitschrift f. Angewandte Zoologie* **3**, 1-15.
- Hertel, R.F. (1993) *Environmental Health criteria 145 Methylparathion*, World health organisation. Geneva.
- Jeppesen C. et Nielsen P.E. (1989) Photofootprinting of drug-binding sites on DNA using diazo and azido-9-aminoacridine derivatives. *Eur.j.Biochem.* **182**, 437-444.
- Josupeit H. (1999) "An overview on the World shrimp market, World Shrimp Conference, Madrid, Spain"
- Kristin E.S.M.S.D. (1990) Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic toxicology* **18**, 101-114.
- Lall R., Sen D., Saha M.R., Bose A.K., De S.P. et Palchowdhury N.C. (1979) Prevalence of *Vibrio paraheamolyticus* in Port Blair. *Indian Journal Med. Res.* **69**, 217-221.
- Lavilla-Pitogo C.R., Leano E.M. et M.G. Paner (1998) Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with the dominance of luminescent *vibrios* in the rearing environment. *Aquaculture* **164**, 337-349.
- Le Moullac G., Soyes C., Saulnier A., Avarre J.C. et Levy P. (1998) Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and Shellfish Immunology* **8**, 621-629.
- Lightner, D.V. (1996) *A handbook of shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid shrimp*, World aquaculture society, Baton rouge edn.

L.A.

Lightner (1993). Diseases of cultured penaeid shrimp In: *CRC handbook of mariculture* (ed. by D.V. Lightner), pp. 393-486. James P. Mc Vey. Florida, USA

Lightner D.V. et Sindermann C.J. (1988) Vibrio disease of Penaeid shrimp. *Disease, diagnosis and control in North American Marine Aquaculture Developments in aquaculture and Fisheries Sciences* **17**, 42-47.

Lundebye A.K., Curtis T.M., Braven J. et Deplege M.H. (1997) Effects of the organophosphorous pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (AChE) activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Aquatic Toxicology* **40**, 23-36.

Mee, L.D., Readman, J.W. et Gonzalez-Parias, F (1991). Fate of agrochemicals in tropical coastal lagoon ecosystems. *Science, R.a.D.*, (Ed.), Brussels:

Nelson D.R. (1999) Protecting the health of farmed Fish. *Maritimes* **41**, 13-15.

Paez-Osuna F., Guerrero-Galvan S.R. et Ruiz-Fernandez A.C. (1998) The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in Mexico. *Marine Pollution Bulletin* **36**, 65-75.

Parrish, P.R. (1985). Acute toxicity tests In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (ed. by P.R. Parrish), Hemisphere Publishing Corporation. New York

Payne J.F., Mathieu A., Melvin W. et Fancey L.L. (1996) Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in Association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* **32**, 225-231.

Peakhall, D. (1992) *Animal biomarkers as pollution indicators*, Chapman and Hall Ecotoxicology Series edn.

Ranga-Rao K. et Doughtie D.G. (1984) Histopathological Changes in Grass Shrimp exposed to Chromium, Pentachlorophenol and Dithiocarbamates. *Marine Environmental Research* **14**, 371-395.

Readman J.W., Liong Wee Kwong L., Mee L.D., Barcotti J., Nilve G., Rodriguez-Solano J.A. et Gonzales-Farias F. (1992) Persistent organophosphorus pesticides in the tropical

- marine environments. *Marine Pollution Bulletin* **24**, 398-402.
- Reddy M.S. et Rao K.V.R. (1986) Acute toxicity of insecticides to penaeid prawns. *Environ. Ecol.* **4**, 221-223.
- Reddy M.S. et Rao K.V.R. (1988) In vivo recovery of acetylcholine esterase activity from phosphamidon and methylparathion induced inhibition in the nervous tissue of penaeid prawn (*Metapenaeus monoceros*). *Bull. Environ. Contam. Toxic.* **40**, 752-758.
- Reddy P.M. et Philip G.H. (1994) In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpoi* exposed to technical grade cypermethrin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52**, 619-626.
- Reiter M.A. (1997) *Journal of Freshwater Ecology* **12**, 163-165.
- Rosenberry, B. (2001) *World shrimp farming 2000*, Shrimp news international. San Diego, USA.
- Schimmel S., Garnas R., Patrick J. et Moore J. (1983) Acute toxicity, bioconcentration and persistence of AC 222,705, benthocarb, chlorpyrifos, fenvalerate, methylparathion and permethrin in the estuarine environment. *J. Agric. Food. Chem.* **31**, 104-113.
- Semarnap (Secretaria de Medio Ambiente, r.N.y.p.s.d.p. (1999) *Atlas de Enfermedades de Peneidos*, Direccion general de Acuicultura. Mexico.
- Shugart L.R., NcCarthy J.F. et Halbrook R.S. (1992) Biological markers of the environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Analysis* **12**, 353-360.
- Sniesko S.F. (1974) The effect of environmental stress on the outbreaks of infectious disease of fishes. *Journal of fisheries Biology* **6**, 197-208.
- Soderhall K. et Cerenius L. (1992) Crustacean immunity. *Annual Rev. of Fish Disease* 3-23.
- Sonntag B., Posch T. et Psenner R. (2000) Comparison of three methods for determining flagellate abundance, cell size, and biovolume in cultures and natural freshwater samples. *Archiv fur Hydrobiologie.* **149**, 337-351.

- Srinivasulu M., Reddy M., Jayaprada P. et Ramano-Rao K.V. (1990) Impact of methylparathion on cholinergic and non-cholinergic enzyme systems of Penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros*. *Biochemistry International* **22**, 769-779.
- Srinivasulu M. et Ramana-Rao K.V. (1991) Methylparathion induced alterations in the tissue carbohydrate catabolism of the marine prawn, *Metapenaeus monoceros*. *Bulletin of Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 925-932.
- Sudheesh P.S. et Xu H.S. (2001) Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular products. *Aquaculture* **196**, 37-46.
- Turnbull I. (1993) Feeding responses of daphnia magna under exposure to toxic chemicals. PhD Thesis in the department of animal and plant science. University of Sheffield
- Vandenbergh J., Verdonck L., Robles-Arozarena R., Rivera G., Bolland A., Balladares M., Gomez-Gil B., Calderon J., Sorgeloos P. et Swings J. (1999) Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probionts. *Applied and Environmental Microbiology* 2592-2597.
- Vargas-Albores F. et Yepiz-Plascencia G. (1998) Shrimp immunity. *Trends in Comparative Biochem. and Physiol.* **5**, 195-210.
- Vazquez-Dominguez E., Peters F., Gasol J.M. et Vaquer D. (1999) *Aquatic Microbial Ecology [Aquat. Microb. Ecol.]* **20**, 119-128.
- Vogt G. (1987) Monitoring of environmental pollutants such as pesticides in Prawn aquaculture by histological diagnosis. *Aquaculture* **67**, 157-164.
- Wayne, S.M., Meek, A.H. et Willeberg, P. (1987) *Veterinary Epidemiology principles and methods*, first edn. Iowa State University Press. Iowa state university, USA.
- Weis J., Cristini A. et Rango-Rao K. (1992) Effects of pollutants on molting and generation in Crustacea. *Amer. Zool.* **32**, 495-500.
- Williams L.A. et La Rock P. (1985) Temporal occurrence of *Vibrio* spp and *A. hydrophila* in estuarine sediments. *Applied environmental microbiology* **50**, 1490-1495.

- Wolff M.S., Mc Connell R., Cedillo L. et Rivera M. (1992) Dermal levels of methylparathion, organochlorine pesticides and acetylcholinesterase among formulators. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **48**, 671-678.
- Woods, A.E. et Ellis, R.C. (1996) *Laboratory histopathology, A complete reference*, Chuchill livingstone.
- Xu H.S., Zhang X.H., Xu B., Ji W.S., Yang X.S. et Ma J.K. (1999) Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus chinensis* using an indirect fluorescent antibody staining procedure. *World Journal of Microbiology & Biotechnology [World J. Microbiol. Biotechnol.]* **15**, 285-287.
- Ying C. et Chengping L. (2000) Application of green fluorescent protein marked bacteria to investigate the site of Ag uptake in *Carassius auratus ibelio*. *Journal of fisheries of China* **24**, 472-475.

ANNEXES

Annexe 1. : Préparation de l'aliment contenant le méthylparathion

Préparation de l'aliment contenant la concentration 6,48µg MPAR/g.

La concentration initiale de méthylparathion (MPAR) était de 97,756g/l. (TECKHEM. Mexico)

1. 100 µl de cette solution ont été ajoutés à 1000µl d'acétonitrile (solvant pour le méthylparathion, OMNISOLV AXO142-1, EM Science). La concentration finale de cette solution était de 88,865 µg MPAR/µl.
2. 100 µl de cette solution ont été ajoutés à 1000 µl d'acétonitrile. La concentration de cette solution était donc 8,0786 µg MPAR/µl.
3. 149 µl de cette dernière solution ont été ajoutés à 29851 µl d'acétonitrile afin d'obtenir 30ml d'une solution ayant une concentration finale de 0,040 µg MPAR/µl.
4. 25g de croquettes d'un poids moyen de 0,00817(±0,00198) g/croquette ont été ajoutés au 30ml de la dilution de méthylparathion. Les croquettes étaient immergées pendant 1 minute dans un récipient opaque. L'excès de la solution était enlevé (25,95ml). 4,05 ml de la solution de méthylparathion était donc absorbée par l'aliment ce qui donnait une concentration de 6,48 µg MPAR/g d'aliment.
5. Les croquettes étaient ensuite séchées pendant 30 minutes pour permettre l'évaporation du solvant. La nourriture ainsi préparée était stockée dans un récipient en ver opaque et congelé jusqu'à utilisation.

Préparation de l'aliment ayant une concentration de 19,04µg MPAR/g d'aliment.

La concentration initiale de méthylparathion (MPAR) était de 97,756g/l. (TECKHEM. Mexico)

1. 100 µl de cette solution ont été ajoutés à 1000µl d'acétonitrile (solvant pour le méthylparathion, OMNISOLV AXO142-1, EM Science). La concentration finale de cette solution était de 88,865 µg MPAR/µl.
2. 100 µl de cette solution précédente ont été ajoutés à 1000 µl d'acétonitrile. La concentration de cette solution était donc 8,0786 µg MPAR/µl.

3. 300 µl µl de cette dernière solution ont été ajoutés à 29700 µl d'acétonitrile afin d'obtenir 30ml d'une solution ayant une concentration finale 0,0808 µg MPAR/µl.
4. 25g de croquettes d'un poids moyen de 0,00817(±0,00198) g/croquette ont été ajoutés au 30ml de la dilution de méthylparathion. Les croquettes ont été immergées pendant 1 minute dans un récipient opaque. L'excès de la solution était enlevé (24,1 ml). 5,9 ml de la solution de méthylparathion était donc absorbée par l'aliment ce qui donnait une concentration de 19,06 µg MPAR/g d'aliment.
5. Les croquettes étaient ensuite séchées pendant 30 minutes pour permettre l'évaporation du solvant. La nourriture ainsi préparée était stockée dans un récipient en verre opaque et congelé jusqu'à utilisation.

Préparation de l'aliment ayant les concentrations 2,7µg MPAR/g, 4,04µg MPAR/g et 5,66µg MPAR/g d'aliment.

Les étapes 1,2,4 et 6 sont identiques à celles décrites précédemment.

- Pour l'aliment contenant **2,7µg MPAR/g**, 50µl de la solution de MPAR obtenu dans l'étape 2 ont été ajoutés à 29950µl d'acétonitrile pour obtenir 30ml d'une solution ayant une concentration finale de 0,0135 µg MPAR/µl. De cette solution, 5ml ont été absorbés par les croquettes, ce qui donnait une concentration de 2,7 µg MPAR/g d'aliment.
- Pour l'aliment contenant **4,04µg MPAR/g**, 75µl de la solution de MPAR obtenu dans l'étape 2 ont été ajoutés à 29925µl d'acétonitrile afin d'obtenir 30ml d'une solution avec une concentration finale de 0,0202 µg MPAR/µl. Les croquettes ont été immergées dans cette solution et laissées en contact pendant 30 secondes. 5ml de cette solution ont été absorbés par l'aliment, ce qui donnait une concentration finale de 4,04 µg MPAR/g d'aliment.
- Pour la nourriture contenant **5,66µg MPAR/g**, 75µl de la solution de MPAR obtenu dans l'étape 2 ont été ajoutés à 29925µl d'acétonitrile afin d'obtenir 30ml d'une solution avec une concentration finale de 0,0202 µg MPAR/µl. Les croquettes ont été immergées dans cette solution et laissé en contact pendant 1 minute. 7ml de cette solution était absorbé par l'aliment ce qui donnait une concentration finale de 5,66 µg MPAR/g d'aliment.

Annexe 2.: Réactifs utilisés pour la préparation de *Vibrio parahaemolyticus*.

Saline stérile 2,5% NaCl	500ml
Eau distillée	500ml
NaCl (MERCK)	12,5g
TSB (Trypton Soy Broth), 2,5% NaCl	100ml
Eau distillée	100ml
TSB (BIOXIN)	3g
NaCl	2g
Pirophosphate de Sodium (Na₄P₂O₇), 0,02M, 1,5% NaCl	100ml
Eau distillée	100ml
Na ₄ P ₂ O ₇ (FAGALAB, Mexico)	0,892g
NaCl	1,5g
PBS, 0,05M, 1,5%NaCl, pH=9	100ml
NaH ₂ PO ₄ (FAGALAB, Mexico)	0,689g
Na ₂ HPO ₄ (FAGALAB, Mexico)	0,670g

Annexe 3: Protocoles de coloration.

1. Protocoles de coloration utilisés dans l'étude préliminaire 1.

1.1 Haematoxyline

- Xylène 5 min
- Xylène 5 min
- Alcool absolu 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 95% 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 80% 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 50% 2 min
- Eau distillée 2 min
- Haematoxyline 4 min
- Alcool 96% 2 min
- Alcool absolu 2 min
- Xylène 5 min
- Xylène 5 min

1.2 Eosine

- Xylène 5 min
- Xylène 5 min
- Alcool absolu 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 95% 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 80% 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 50% 2 min
- Eau distillée 2 min
- Eosine 1 min 30 sec
- Alcool 96% 2 min
- Alcool absolu 2 min
- Xylène 5 min
- Xylène 5 min

1.3 Blanc

- Xylène 5 min
- Xylène 5 min
- Alcool absolu 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 95% 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 80% 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 50% 2 min
- Eau distillée 2 min
- Alcool 96% 2 min
- Alcool absolu 2 min
- Xylène 5 min
- Xylène 5 min

2. Protocoles de coloration utilisés dans l'étude finale.

Dans l'étude finale toutes les sections étaient colorées avec l'haematoxyline et éosine.

- Xylène 5 min
- Xylène 5 min
- Alcool absolu 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 96% 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 80% 3 min 30 sec
- Alcool éthylique 50% 2 min
- Eau distillée 5 immersions
- Haematoxyline 30 sec
- Rinçage à l'eau 5 min
- Eosine 2 min
- Alcool 96% 3 min 30 sec
- Alcool absolu 3 min 30 sec
- Xylène 3 min 30 sec
- Xylène 3 min 30 sec

Annexe 4. Les réactifs et solutions utilisés pour la détermination de l'activité acétylcholine estérase (AChE).

1.1 Réactifs utilisés afin de mesurer l'activité AChE.

- Phosphate de potassium di, et monobasic K_2HPO_4 (SIGMA); KH_2PO_4 (SIGMA)
- Acetylthiocholine iodide ($C_7H_{16}NOS$) (SIGMA)
- DNTB 5,5-dithio-bis(acide 2-nitrobenzoic) (SIGMA)
- Bicarbonate de sodium, $NaHCO_3$ (SIGMA)

1.2 Réactifs utilisés pour la mesure de la quantité de protéines.

- BIO-Rad protein assay dye reagent concentrate (BIORAD Laboratories)
- Bovine γ -globulines (SIGMA)

1.3 Solutions utilisées.

1.3.1 Tampon phosphate

Un tampon phosphate de 0,1M, pH = 7,2 était préparé. une solution de 0,1M de K_2HPO_4 Et une autre de 0,1M de KH_2PO_4 étaient faits en ajoutant respectivement 17,42g/l of K_2HPO_4 et 13,6 g/l of KH_2PO_4 à de l'eau distillée.

A 200 ml de la solution acide (KH_2PO_4), la base (K_2HPO_4) était ajoutée jusqu'à obtention d'une pH de 7,2. Le pH était mesuré avec un pH mètre (pH/ion analyser 350, CORNING).

1.3.2 Solution d'acétylthiocoline

Une solution de 0,075M était préparée en ajoutant 10,835 mg de acétylthiocholine iodide à 0,5 ml d'eau ultra purifiée (HPLC).

1.3.3 Solution de DTNB

Une solution de DTNB 10mM était préparée en ajoutant 19,8 mg de DTNB à 5ml de tampon phosphate. A cette solution, 7,5 mg de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) était ajouté.

1.3.4 Réactif A pour mesurer l'activité AChE.

0,2 ml de la solution d'acétylthiocholine et 1 ml de la solution de DTNB étaient ajoutés à 30 ml de tampon phosphate. Ce réactif était préparé extemporanément quand nécessaire et gardé dans l'obscurité en couvrant le récipient avec de l'aluminium, au réfrigérateur jusqu'au besoin.

1.3.5. Réactif B pour la détermination des protéines.

Une solution de 1:4 était faite utilisant le concentré de BIO-RAD en ajoutant 6 ml du réactif à 24 ml d'eau HPLC. Ce réactif était préparé extemporanément quand nécessaire.

1.3.6. Solution mère pour la courbe standard de protéines.

Une solution mère de globuline bovine d'une concentration de 0,4mg/ml était préparée, divisée en tubes eppendorf et congelée jusqu'au besoin. Cette solution de base était diluée aux concentrations désirées quand nécessaire.

Annexe 5. Procédure suivie pour la capture d'image numériques.

Cette procédure permet d'obtenir une image brillante, illuminée de façon homogène sans reflets.

- Remonter le condensateur.
- Mettre au point sur le spécimen avec un objectif de x10 ou x6.
- Fermer le diaphragme de la lampe à la base du microscope tout en observant le spécimen.
- Abaisser légèrement le condensateur jusqu'à ce que le diaphragme soit mis au point.
- Centrer l'image en utilisant les vis de centrage du condensateur.
- Ouvrir le diaphragme jusqu'aux limites du champ et remettre au point, puis ouvrez davantage afin de rendre tout le champ visible.
- Ajuster le contraste cette fois-ci, en utilisant le diaphragme du condensateur.
- Enlever l'objectif oculaire pour vérifier que 75% de l'aperture visible est rempli de lumière.

Annexe 6. Classification des lésions en grades .

Hépatopancréas

La présence d'inflammation, d'une atrophie tubulaire, d'une vacuolisation des cellules R ainsi que la présence de nodules haemocytaires ont été recherchés dans l'hépatopancréas. Pour chaque critère, la présence ou l'absence de lésion a été notée en même temps qu'une gradation de l'intensité des lésions.

Quand de l'inflammation était présente, elle était observée au centre de l'hépatopancréas ou à la périphérie. L'intensité de l'inflammation étant variable, trois grades ont été donnés en fonction de l'intensité des lésions (Figures 1, 2, 3, 4, 5 et 6. et tableau 1).

Tableau 1 : Différents grades attribués à l'inflammation observée dans l'hépatopancréas.

Grade	Description de la lésion
a	Absence d'inflammation
b	Infiltration haemocytique modérée
c	Infiltration haemocytique prononcée

Quand une atrophie tubulaire de l'hépatopancréas était constatée, trois grades ont également été attribués (tableau 2 et figures 7, 8, et 9).

Tableau 2 : Différents grades attribués à l'atrophie tubulaire détectée dans l'hépatopancréas.

Grade	Description de la lésion
a	Absence d'atrophie
b	Atrophie tubulaire focale
c	Atrophie tubulaire extensive

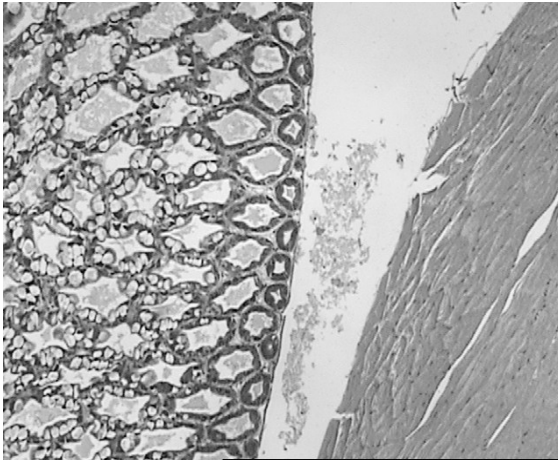


Figure 1 : Section transversale de l'hépatopancréas montrant une périphérie normale classifiée grade "a", noter qu'aucune inflammation n'est visible*. (x50.)

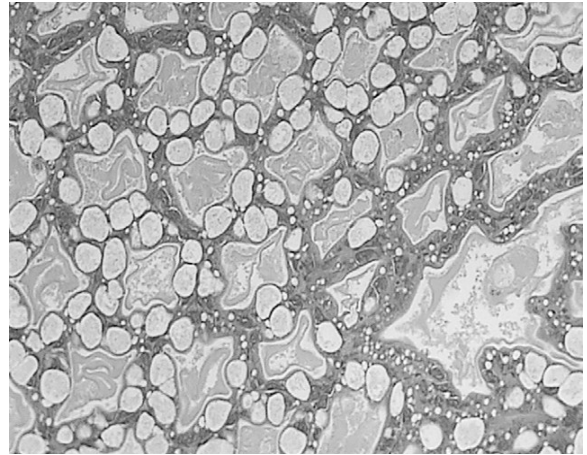


Figure 2. Section transversale de la partie centrale de l'hépatopancréas montrant une structure normale classifiée grade "a", noter qu'aucune inflammation n'est visible*. (x100.)

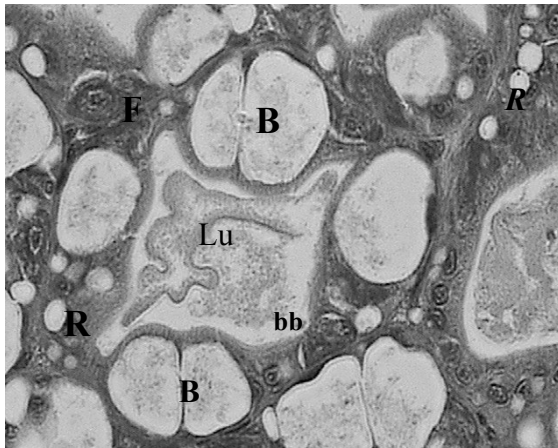


Figure 3. Structure normale de la région proximale d'un tubule de l'hépatopancréas. Remarquez les cellules R (R), B (B), F (F), bordure en brosse (bb), et lumen (Lu).* (x400).

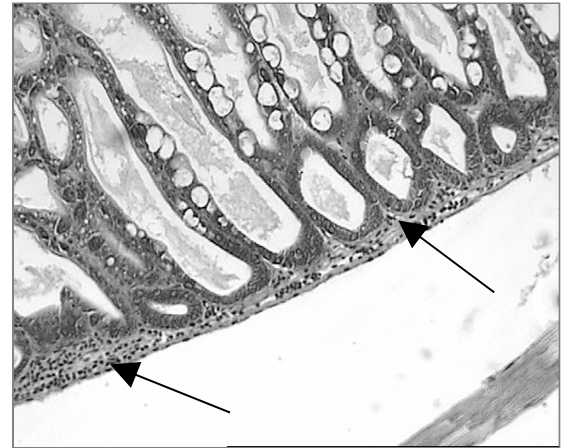


Figure 4. Section longitudinale de l'hépatopancréas montrant de l'inflammation périphérique classifiée grade "b", noter l'infiltration haémocytaire légère et focale (flèche noire)*. (x50).



Figure 5. Section longitudinale de la partie centrale de l'hépatopancréas montrant de l'inflammation classifiée grade "b", noter l'infiltration haémocytaire peri-tubulaire légère (Flèche noire)*. (x100).

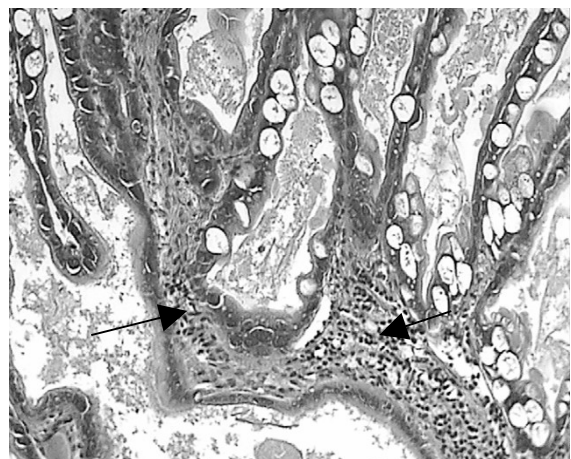


Figure 6. Section longitudinale de la partie centrale de l'hépatopancréas montrant de l'inflammation classifiée grade "c", noter l'infiltration haémocytaire centrale (Flèche noire). x100.

*Section longitudinale de paraffine 2µm, coloration H&E, fixatif de Davidson's.

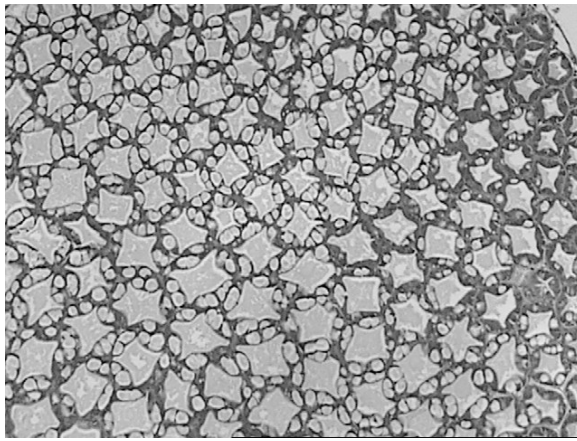


Figure 7. Section longitudinale de la partie centrale de l'hépatopancréas montrant une structure tubulaire normale classifiée grade "a", noter qu'aucune atrophie de tubules ne peut être observée*. (x50).

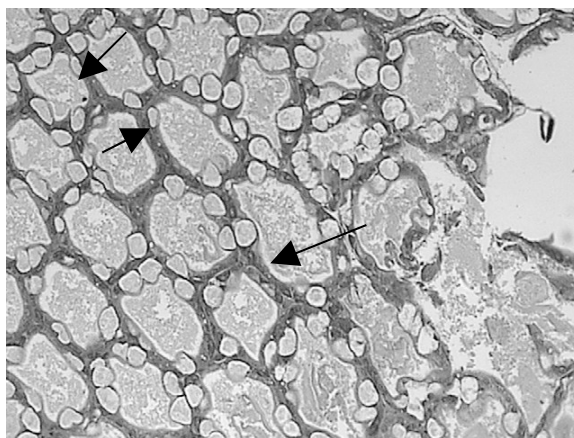


Figure 8. Section longitudinale de la partie centrale de l'hépatopancréas montrant de l'atrophie tubulaire classifiée grade "b", noter l'atrophie focale légère de quelques tubules (Flèches noires)*. (x100).

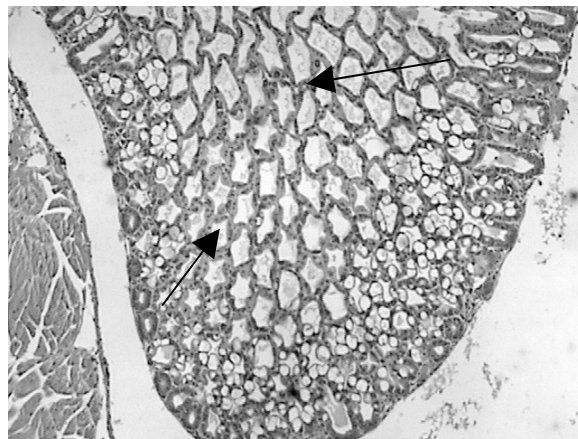


Figure 9. Section longitudinale de la partie centrale de l'hépatopancréas montrant de l'atrophie tubulaire classifiée grade "c", noter l'atrophie extensive des tubules de l'hépatopancréas (Flèches noires)*. x50.

**Section longitudinale de paraffine 2µm, coloration H&E, fixatif de Davidson's.*

La vacuolisation des cellules R des tubules de l'hépatopancréas était variable. Une échelle de 3 grades a encore été établie. (tableau 3 et figures 10, 11, et 12).

Tableau 3: Différents grades attribués à la vacuolisation des cellules R dans l'hépatopancréas.

Grade	Description de la lésion
a	Peu à pas de vacuolisation
b	Vacuolisation clairement visible
c	Quantité très importante de vacuoles

De la même façon, quelques sections ont présenté des nodules haemocytaires dans l'hépatopancréas. La présence ou l'absence de ces nodules a été enregistrée. Le nombre de nodules par coupe s'est étendu de 0 à 5. Pour chaque organe, le nombre de nodules a été noté et gradé comme illustré dans le tableau 4 et figure 13.

Tableau 4: Les différents grades attribués au nombre de nodules haemocytaires présents dans l'hépatopancréas.

Grade	Description de la lésion
a	Absence de nodules haemocytaires
b	Présence de 1 nodule haemocytaire
c	Présence de plus de 2 nodules haemocytaires

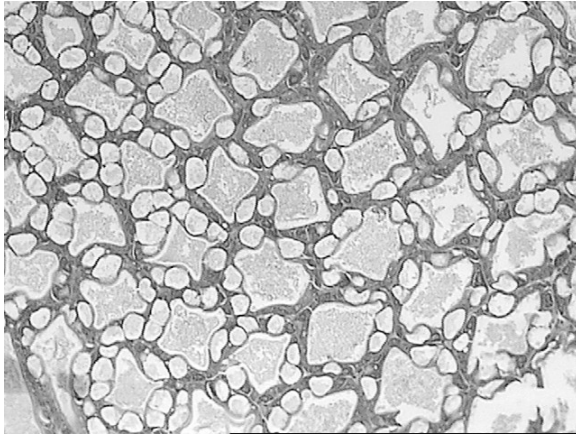


Figure 10. Section longitudinale de la partie centrale de l'hépatopancréas montrant la vacuolisation de cellules R classifiée grade "a", noter l'absence de vacuolisation dans les cellules R (R)*. (x100).

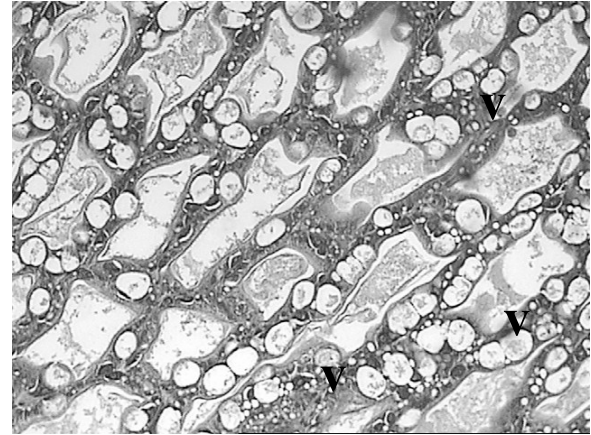


Figure 11. Section longitudinale de la partie centrale de l'hépatopancréas montrant la vacuolisation de cellules R classifié grade "b", noter la présence de vacuolisation (v) dans les cellules R*. (x100).

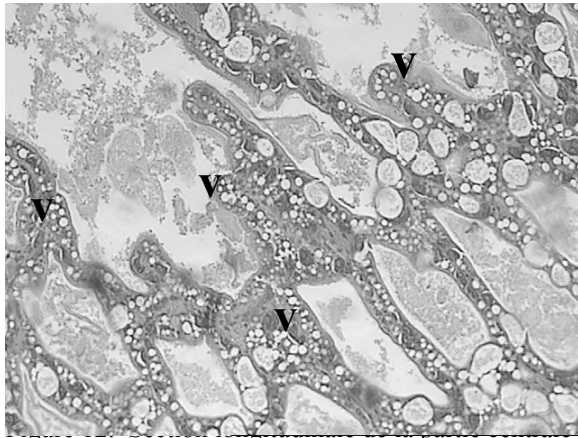


Figure 12. Section longitudinale de l'hépatopancréas montrant la vacuolisation de cellules R classifié grade "c", noter la présence d'une grande quantité de vacuoles (v) dans les cellules R*. (x50).

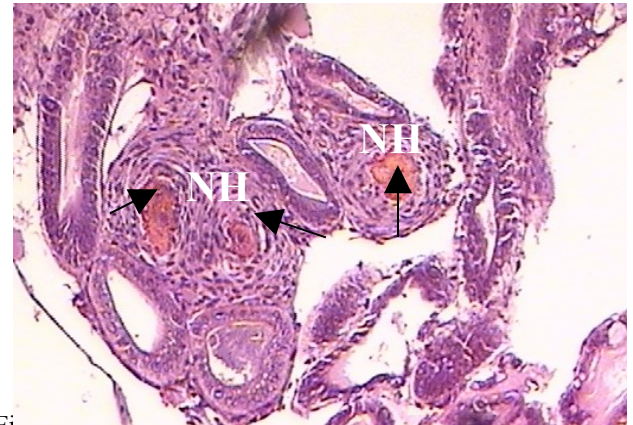


Figure 13. Section longitudinale de l'hépatopancréas montrant des nodules haémocytaire (NH), noter les centres nécrotiques (Flèches noirs)*. (x100).

*Section longitudinale de paraffine 2 μ m, coloration H&E, fixatif de Davidson's.

Muscle

De la nécrose, de l'inflammation, une apparence calcifiée, et de la vacuolisation ont été notés dans les muscles. Ces lésions ont été majoritairement remarquées dans les muscles des segments abdominaux. La présence ou l'absence de ces lésions a été analysée dans chaque section et. une gradation de l'intensité des lésions a été effectuée. (tableau 5 et figures 14 à 16).

Tableau 5: Différents grades attribués aux lésions observées dans le muscle.

LESIONS			
Grade	nécrose	inflammation	lésions à apparence calcifiée
a	absent	absent	absent
b	Quelques foyers nécrotiques	infiltration haemocytaire modérée	Quelques lésions à apparence calcifiée à localisation focale
c	Nécrose plus extensive	infiltration haemocytaire plus extensive	Lésions à apparence calcifiée plus nombreuse
d	Nécrose d'une partie substantielle du faisceau musculaire	Infiltration haemocytaire d'une partie substantielle du faisceau musculaire	Grandes lésions extensives à apparence calcifiée

Une vacuolisation musculaire a été observée dans les muscles des segments abdominaux (figure 17). Etant donné que la plupart des animaux ont présenté cette lésion, seulement sa présence ou son absence a été notée.

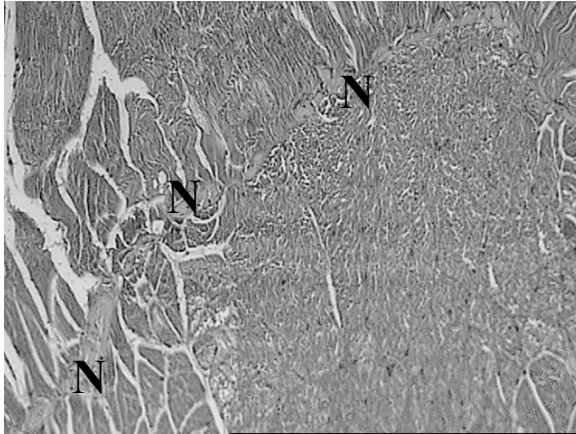


Figure 14. Section d'un faisceau musculaire montrant des signes de légère nécrose musculaire (N), grade "b", aucune infiltration haemocyttaire n'est visible, grade "a", noter qu'aucune lésion à apparence calcifiée n'est présente dans cette section*. (x100).

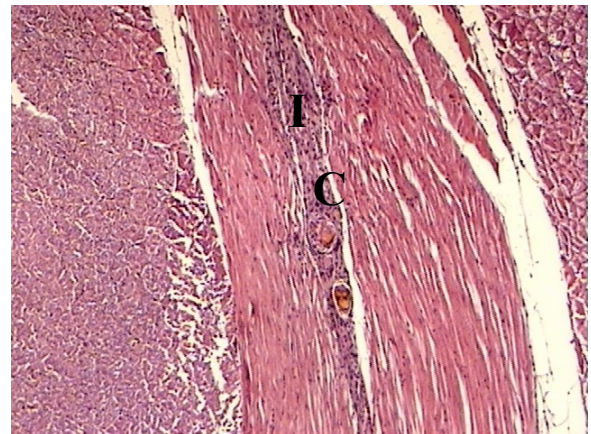


Figure 15. Section d'un faisceau musculaire montrant une infiltration haemocyttaire extensive (I), grade "c" et des lésions à apparence calcifiée (C) de grade "b". * (x100).

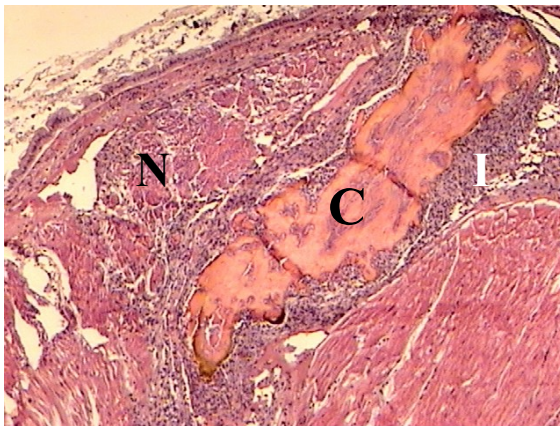


Figure 16. d'un faisceau musculaire montrant de la nécrose, de l'inflammation et une lésion à apparence calcifiée de grade "d". Noter l'étendue de la nécrose (N), l'inflammation (I), et de la lésion d'apparence calcifiée (C)*. (x50).

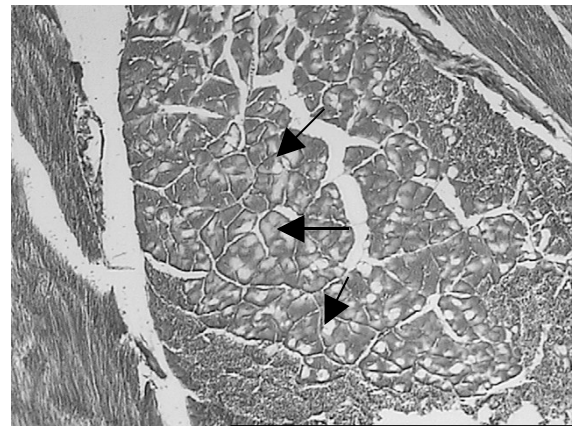


Figure 17. Section d'un faisceau musculaire montrant de la vacuolisation (flèche noir)*. (x50).

*Section de paraffine longitudinale 2 μ m, coloration H&E, fixatif de Davidson's.

Organe lymphoïde

Dans quelques sections, des nodules haemocytaires ont été trouvés dans l'organe lymphoïde. Le nombre de nodules haemocytaires variant de 0 à 24 selon les sections, un classement de ces lésions en trois grades a été établi (tableau 6 et figure 18)

Tableau 6: Attribution des grades selon le nombre de nodules haemocytaires présents dans l'organe lymphoïde.

Grade	Nombre de nodules haemocytaires dans l'organe lymphoïde
a	0
b	≤ 2
c	$2 < \leq 5$
d	$5 < \leq 7$
e	> 7

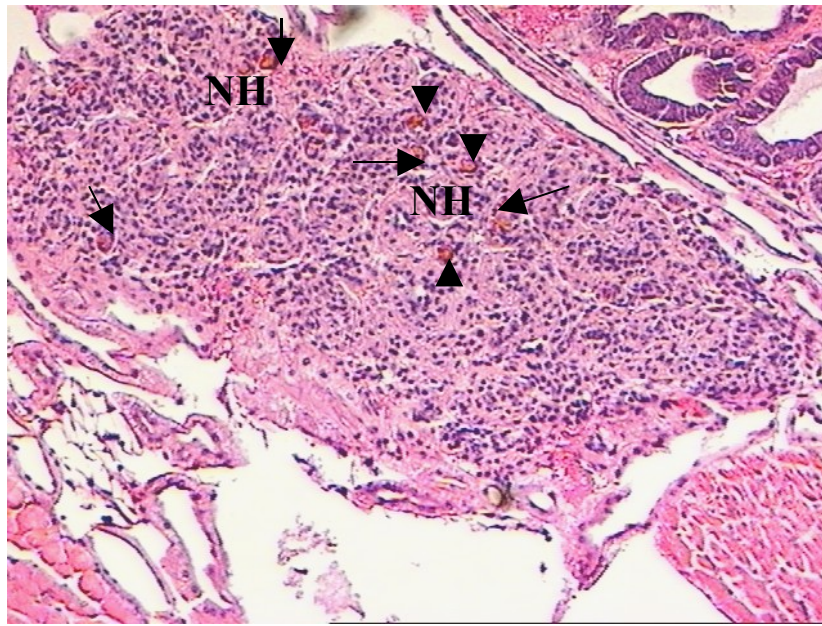


Figure 18. Section dans un organe lymphoïde contenant des nodules haémocytaires (NH). Section longitudinale de paraffine 2 μ m, coloration H&E, fixatif de Davidson's, x50.

Toulouse, 2001

NOM : LABRIE

PRENOM : LAURA

TITRE : EFFET DU MÉTHYLPARATHION PAR ADMINISTRATION ORALE SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA VIBRIOSE OCCASIONÉE PAR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* CHEZ LA CREVETTE BLANCHE (*LITOPENAEUS VANNAMEI*)

RESUME : Sous la pression accrue des instances visant à protéger l'environnement, les organophosphorés, carbonates et pyrethrinoides, remplacent depuis une vingtaine d'années les pesticides plus persistants dans l'environnement tels que les organochlorés. S'ils sont rapidement dégradables dans l'environnement, ces composés sont néanmoins susceptibles d'affecter des espèces non cibles comme les crevettes. Ils peuvent induire une réduction de la croissance et une sensibilité accrue à des infections bactériennes et virales ou même une mortalité directe.

Après différentes études préliminaires visant à préciser les colorations tissulaires à effectuer et les concentrations sub-létales en toxique, des crevettes blanches (*Litopenaeus vannamei*) juvéniles ont été exposées oralement avec 6,48 µg de méthylparathion (MPAR) par gramme de nourriture pendant 4 jours. Ces animaux ont ensuite subi une injection intramusculaire de *Vibrio parahaemolyticus* le jour 5. Les groupes contrôle ont été constitués de : crevettes nourries avec le MPAR puis injectées avec une solution saline stérile, de crevettes nourries avec de l'acétonitrile (solvant du MPAR) et injectées avec la bactérie (V), et de crevettes recevant de l'acétonitrile puis injectées avec une solution saline stérile. La mortalité a été enregistrée et tous les animaux ont été collectés pour un examen histologique à la fin des 8 jours d'expérience. L'analyse des mortalités cumulées au jour 8 a montré que le traitement combiné (MPAR/V) était significativement différent des autres traitements ($\chi^2 = 35,6$, DL=3, $p < 0,001$). Les analyses histologiques ont révélé un développement de vibriose dans les deux groupes recevant l'injection bactérienne (MPAR/V et V). L'analyse des résultats a montré une association entre les lésions observées et l'injection de la bactérie. Par contre, aucune lésion n'a été associée à l'exposition orale au MPAR. Il semble que dans le traitement combiné les crevettes développent une vibriose plus intense. En conclusion, le méthylparathion peut agir comme un facteur de stress augmentant le risque de vibriose.

Bien que le méthylparathion soit un inhibiteur de l'activité acétylcholine estérasique, aucune inhibition de cette activité n'a été détectée aux concentrations utilisées dans cette étude.

MOTS CLEFS : AQUACULTURE-CREVETTE-ORGANOPHOSPHORÉ-MÉTHYLPARATHION-BACTÉRIE-VIBRIOSE-*V. PARAHAEMOLYTICUS*.

ENGLISH TITLE: EFFECT OF METHYLPARATHION ON THE SUSCEPTIBILITY OF SHRIMP TO BACTERIAL CHALLENGE.

ABSTRACT: Under increasing pressure of environmental regulations, a replacement of persistent pesticides (organochlorines) by more rapidly degradable products (organophosphates) has been observed over the past two decades. However, these pesticides can effect non-target species through environmental exposure and induce alterations such as slow growth and increased susceptibility to viral and bacterial infections.

In this study juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) were exposed orally to 6.48 µg of methylparathion per gram of feed for 4 days and injected intramuscularly with *Vibrio parahaemolyticus* on day 5 (MPAR/V). The concentration of MPAR added to the pellets was determined in a preliminary study. Control groups consisted of shrimp fed with methylparathion (MPAR) and injected with sterile saline solution, shrimp fed with pellets containing acetonitrile (solvent for MPAR), injected with the bacteria (V), and shrimp fed with pellets containing acetonitrile, injected with sterile saline solution. Mortality was recorded and all the animals were sampled for histology at the end of 8 days. Cumulative mortalities at day 8 showed that the combined treatment (MPAR/V) was significant different from the other treatments ($\chi^2 = 35.6$, DL=3, $p < 0.001$). Histologically, the development of vibriosis was clearly observed in the two groups receiving the bacterial injection (MPAR/V and V), and analysis of the data illustrated an association between the observed lesions and the injection of bacteria. However no lesions seemed to be associated to the oral exposition with methylparathion. We found that methylparathion may act as a stressor in the development of vibriosis.

Methylparathion is an inhibitor of acetylcholine esterase (AChE) activity but no inhibition of AChE activity was detected at concentrations of MPAR used in this study.

We attempted to visualise the progression of the bacteria by different staining techniques. The use of DTAF to label the bacteria seemed an inappropriate technique and the counterstaining with DAPI, eosin or haematoxylin did not give satisfactory results.

KEY WORDS: AQUACULTURE-SHRIMP-ORGANOPHOSPHATE-MÉTHYLPARATHION-BACTÉRIA-VIBRIOSIS-*VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*.